

胎生期低亜鉛環境が引き起こす仔における
エピゲノム変化の解析

東京大学大学院 医学系研究科 社会医学専攻

健康環境医工学部門

指導教員： 遠山 千春 教授

栗田 尚佳

要旨

成人期の疾患発症に胎生期の環境要因がエピゲノム変化を介して関与するとの学説 Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) が国際的に注目されている。必須微量元素である亜鉛が胎生期に欠乏することにより、出生後の健康に影響をもたらすことから、亜鉛欠乏のエピジェネティックな影響について検討した。細胞内亜鉛の動態に関与が知られているメタロチオネイン (MT) 焦点を当て解析した。その結果、胎生期低亜鉛環境により仔の MT2 プロモーターでのエピゲノム変化、特にヒストンのアセチル化が亢進し、それが記憶として成熟後まで残り、カドミウム曝露による MT2 誘導増強を引き起こすことが示唆された。本研究の結果は、胎生期の微量元素欠乏がエピゲノム変化を引き起す初めての事例である。

目次

第1章 序論	1
1.1. 胎児期と幼若期の低亜鉛環境と DOHaD との関連性.....	1
1.2. エピゲノム変化と遺伝子発現制御.....	6
1.3. メタロチオネインの生理的役割.....	10
1.4. メタロチオネイン誘導と転写調節機構.....	11
1.5. 本研究の目的.....	16
第2章 方法	17
2.1. 動物.....	17
2.2. 細胞株.....	17
2.3. 胎生期低亜鉛実験（生後 5 週齢）.....	18
2.4. 胎生期低亜鉛実験（生後 1 日齢）.....	22
2.5. 成獣マウス低亜鉛実験.....	23
2.6. Hepal1c7 を用いた Cd 曝露による遺伝子発現量測定.....	23
2.7. 肝臓中金属含有量測定.....	24
2.8. DNA 抽出.....	24
2.9. RNA 抽出.....	25
2.10. レポーター遺伝子コンストラクトの作成.....	25
2.11. デュアルレポーターアッセイを用いた MT2 プロモーターの転写調節機能の解析.....	27
2.12. 定量 RT-PCR 法を用いた遺伝子発現量解析.....	28
.....	29
2.13. Bisulfite Sequencing 法による DNA メチル化解析.....	29
2.14. Methylation sensitive 制限酵素を用いた DNA メチル化解析.....	33
2.15. ChIP qPCR.....	34
2.16. ウェスタンブロット法を用いたタンパク発現量解析.....	37
2.17. 統計解析.....	38
第3章 結果	39
3.1. 胎生期低亜鉛環境で生育した仔マウスの体重および亜鉛、カドミウム蓄積量.....	39
3.2. 胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウス肝臓中の MT1、MT2、MTF1 遺伝子発現量.....	42
3.3. 胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウス肝臓中 MT2 プロモーターの DNA メチル化変化.....	45
3.4. マウス肝がん細胞株 Hepal1c7 を用いた MT2 プロモーターの機能解析.....	48
3.5. 胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウス肝臓における MT2 プロモーターのヒス	

トン修飾変化	50
3.6. 胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウス肝臓における MT2 プロモーターの転写因子結合量変化.....	53
3.7. 胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウス肝臓中の MTF1 タンパク質レベル.....	55
3.8. 胎生期低亜鉛環境で育った生後 1 日齢雄マウス肝臓中 MT1、MT2、MTF1 遺伝子発現量および MT2 プロモーターにおけるエピゲノム修飾変化	56
3.9. 成獣雄マウスの低亜鉛食負荷による MT1、MT2、MTF1 遺伝子発現および MT2 プロモーターにおけるエピゲノム変化	59
3.10. 成獣雄マウスにおける低亜鉛食負荷後、通常食飼育 1 ヶ月後におけるカドミウム曝露時の MT1、MT2、MTF1 遺伝子発現への影響.....	62
第 4 章 考察	64
4.1. 胎生期低亜鉛環境によるヒストン修飾変化はエピジェネティックメモリーとして残り成熟後の MT2 遺伝子誘導増強に關与する	64
4.2. 胎生期低亜鉛食群ではカドミウム曝露後の MT2 プロモーターへの MTF1 結合時間が延長する	67
4.3. 胎生期低亜鉛環境によるヒストン修飾変化はどのようなメカニズムで起きるのか?	69
4.4.胎生期の低亜鉛環境負荷はエピゲノム変化に対して高感受性である.....	71
4.5. 結論	72
4.6. 今後の課題	74
謝辞	76
参考文献	77

略語一覽

AcH3 ; acetylated histone H3

AcH3K9 ; acetylated histone H3 lysine 9

AcH3K14 ; acetylated histone H3 lysine 14

AcH4 ; acetylated histone H4

AhR; aryl-hydrocarbon receptor

ARE ; antioxidant responsive element

BBN; *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine

BDNF; brain-derived neurotrophic factor

CBP ; CREB binding protein

CYP1A1; cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1

DMBA; 7,12-Dimethylbenzo(a)anthracene

DMEM ; dulbecco's modified eagle medium

Dnmt ; DNA methyltransferase

DOHaD ; developmental origins of health and diseases

GRE ; glucocorticoid responsive element

GR1 ; glucocorticoid Receptor

HAT ; histone acetyl transferase

HDAC ; histone deacetylase

HMT ; histone methyl transferase

HP1 ; Heterochromatin Protein 1

H3K4me3 : tri-methylated histone H3 lysine 4

IL6RE ; interleukin6 responsive element

MBD ; methyl-CpG binding domain protein

MeCP2 ; methyl CpG binding protein 2

MT ; metallothionein

MTF1 ; metal responsive element binding transcription factor 1

MRE ; metal responsive element

Nrf ; nuclear factor erythroid-derived 2-related factor

PCAF ; p300/CBP-associated factor

PDE4D4; phosphodiesterase type 4 variant 4

Pdx1; pancreatic and duodenal homeobox 1.

PPAR α ; peroxisome proliferator-activated receptor

PP1c ; protein phosphatase 1 catalytic subunit

STAT ; signal transducers and activator of transcription

Sp1 ; specificity protein 1

TFIID ; transcription factor IID

TSA ; trichostatinA

第1章 序論

1.1. 胎児期と幼若期の低亜鉛環境とDOHaDとの関連性

亜鉛（Zn）は、元素番号 30 の金属元素であり筋肉、血液、肝、骨など体内の多くの臓器に幅広く分布する¹。亜鉛を活性中心に含む酵素は約 300 種類知られており^{2,3}、種々の生理機能に重要な役割を果たしている。亜鉛が欠乏すると免疫機能低下、発育障害、脱毛症、味覚障害、湿疹・皮膚疾患、貧血、性腺機能低下などの症状が現れる²。また、妊娠期の亜鉛欠乏は合併症や分娩異常の発生率、ならび低体重児の出生率を高くするとの報告がある。亜鉛欠乏のハイリスク集団は、亜鉛摂取不足となりやすい菜食主義者⁴、高齢者⁵、アルコール常飲者⁶、ならびに亜鉛要求量が高い乳幼児、妊産婦⁷と推定されている。実際、ラテンアメリカ、アフリカ、アジアにおいて、6~65 ヶ月齢の子供の死亡率の約 4.4%が亜鉛欠乏に起因するという報告がある⁸。これらの地域では潜在的に 5 歳未満の亜鉛欠乏のリスクが高い（Figure 1-1）⁹。

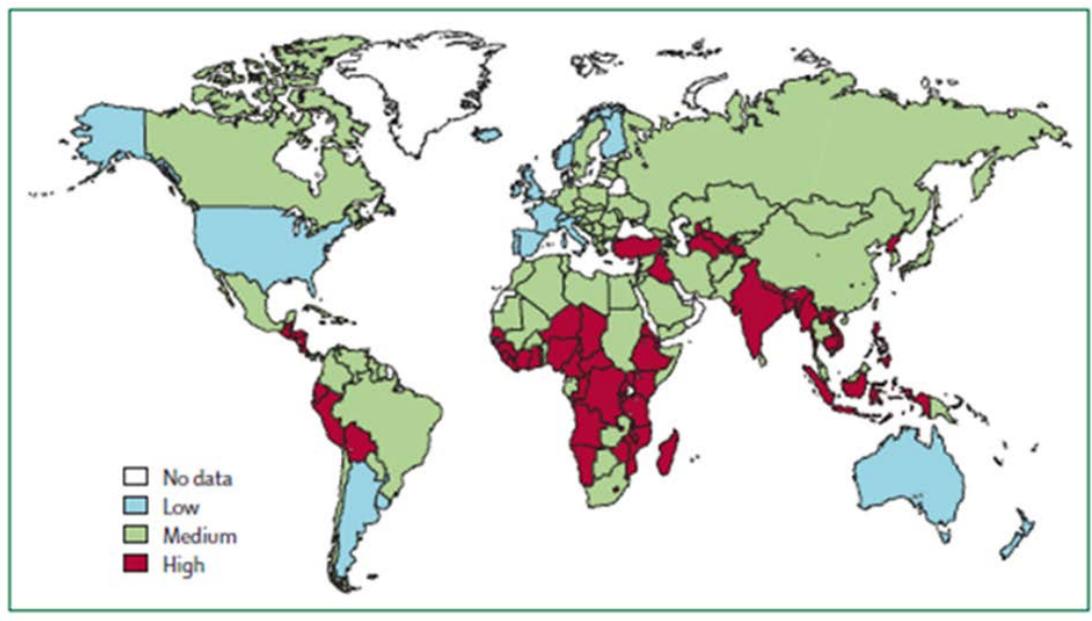


Figure 1-1. 5歳未満の子供における亜鉛欠乏のリスクの分布
 (Black et al., 2008, Lancet) から引用

上記のブラジル、インド、エジプト、南アフリカ、フィリピンなどの国々では1990年代から胎生期、幼若期の微量栄養素欠乏状態の問題と、肥満や生活習慣病の増加の問題とが共存している¹⁰⁻¹⁴。これらの問題は、胎児期・幼若期において亜鉛、鉄、ビタミンAなどの微量栄養素欠乏の影響が子供たちに何らかの負の刷り込みとして残り、近年の食生活の欧米化による微量栄養素の不足、高カロリー食の過剰摂取、運動不足などのこれらの要因が引き金になって、生活習慣病などの罹患率が上昇しているのではないかと考えられている¹⁵⁻¹⁷。

David Barker 博士らは1980年代に英国で実施した疫学調査において、胎生期の低栄養によって引き起こされる男子の出生時の低体重が、冠動脈心疾患のリスク増加と関連することを報告した¹⁸⁻²⁰。さらに、彼らは1924~1944年までに

生まれたフィンランドのコホート集団について、出生時から 12~15 歳までの成長記録と 1971 年からの疾患発症の追跡調査を行った。その結果、低体重で生まれた男児は冠動脈疾患による死亡の危険率が有意に高く²¹、男女を含んだ場合では 2 型糖尿病発症と出生時の低体重との間に有意な相関が認められた²²。以上から、胎生期の低栄養による出生時の低体重は、生育後の生活習慣病発症に関連することが示唆された。これらの研究成果は成人病胎児期発症説（Barker 仮説）として報告されている。

今日、Barker 仮説を拡大させた概念として **Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)** 説が提唱されている。これは、胎生期の低栄養状態のみならず、胎児を取り巻くあらゆる環境が子の生育後の健康と状態を規定する起源になる²³ という概念である。また DOHaD 説で説明される影響は胎児のゲノムにおける DNA メチル化、ヒストン修飾のようなエピゲノム変化によって引き起こされ、その影響は世代を超えて継承される可能性がある²⁴。以下に、DOHaD 説を支持する疫学研究と実験研究に関する知見を記載する。

様々な疫学調査研究によれば、出生時における低体重児は、成人になってから生活習慣病のほか、骨粗鬆症²⁵、自発性甲状腺機能低下²⁶、統合失調症²⁷、うつ病²⁸⁻³¹などに罹患するリスクが増加することが示唆されている。他方、過体重児では成人期でのがんの増加^{32,33}が示唆されている。一方、動物実験研究

において、母マウスの世話を十分に受けずに育った仔で **GR** 遺伝子プロモーターの DNA メチル化が上昇し、ストレスに対して弱くなることが報告されている³⁴。また、内分泌攪乱作用をもつビスフェノール A、あるいは内在性女性ホルモンのエストラジオールを胎児期に曝露されたラットにおいて、加齢によって **PDE4D4** 遺伝子の低メチル化が起こり、前立腺がんの前がん状態が認められている³⁵。さらに、メチル水銀を周産期曝露されたマウスでは、神経細胞内の **BDNF** 遺伝子のプロモーターにおいてヒストン **H3** のアセチル化が減少し DNA メチル化が亢進しており、不安様行動が増加したとの報告がある³⁶。これらの報告は、**Barker** 仮説が提唱された根拠となった妊娠期低栄養により出生した低体重児が成人期以降に生活習慣病への罹患リスクが高まるとの知見のみではなく、環境化学物質曝露や胎生期の生育環境が成熟後の様々な疾患発症に関連することを示唆している。

上記の疫学的・実験的知見は、複数世代を超えて形質が伝達されるのではなく、胎生期環境が第一世代の子において発現するというものであったが胎生期の環境が原因で引き起こされる健康影響が世代を超えて継承されるという事例も幾つか報告されている。スウェーデン人を対象とした疫学調査によれば、冠動脈疾患ならびに 2 型糖尿病発症に両親あるいは祖父母の子供時代の栄養状態が影響するという報告³⁷がある。一方、実験動物を用いた研究において、妊娠

期に低タンパク質食を与えられた母ラット (F₀) から生まれた仔ラット (F₁) は成熟後に高血圧を示し、次世代 (F₂) においても成熟後の高血圧が認められたという報告がある³⁸。さらに、この実験系で F₁, F₂ において肝臓中 GR1 と PPARα 遺伝子のプロモーター領域の DNA の低メチル化が認められている³⁹。農薬のビンクロゾリンを胎生期に曝露された雄ラットでは、精原細胞のアポトーシスが増加し精子数が減少したが、この曝露影響は直接曝露を受けていない第 4 世代まで残っていた⁴⁰。この後世代の精子の DNA メチル化を網羅的に解析したところ、特定の遺伝子座でメチル化パターンが継承されていることが発見された⁴⁰。以上の疫学的・実験的報告は、胎生期の生育環境が引き起こす子へのエピゲノム変化による健康影響は、世代を超えて継承される可能性があることを示唆しており、DOHaD 説を支持している事例である。

これまでに実験動物を用いた研究において、胎生期・幼若期の低亜鉛環境が成熟してからの個体の健康状態に影響を及ぼす DOHaD 説との関連性を示唆する報告がある。例えば、周産期に低亜鉛状態で育ったラットで成熟後に高血圧症状⁴¹、学習記憶異常^{42,43}が確認されている。また胎生期に低亜鉛環境を経験したマウス (Swiss Webster 系統) においては、血漿中 IgM 産生能の低下が世代を超えて続くことが 3 世代まで調べられ報告されている⁴⁴。また、これらの実験動物において、亜鉛の代謝の重要性を示す報告がある。すなわち胎生期低

亜鉛環境を経験し、出生後に通常食により通常の亜鉛環境で生育したマウスでは、重金属毒性軽減、亜鉛の恒常性維持に重要な役割を持つメタロチオネインタンパク質の誘導能が増強することが認められている⁴⁵。このことから、胎生期の低亜鉛環境は成熟期での亜鉛代謝ならびに環境化学物質に対する感受性を変化させる可能性がある。

1.2. エピゲノム変化と遺伝子発現制御

エピジェネティクスとは、塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構であること、細胞世代を超えて遺伝子発現の記憶が継承されることという2つの定義がある。エピジェネティクスは高等真核生物では胚発生・分化のためになくってはならない機構であり、これが破たんすると胎生致死になる。同時に成体でも組織幹細胞や分化の制御のためになくってはならない機構であり、その異常はがんの原因となり、その他の後天的疾患にも関与する可能性が強く示唆されている。エピジェネティクスの実体は DNA メチル化やヒストン修飾、クロマチンの高次構造の変化であり、これらが作り出す細胞内の状態をエピゲノムと総称する。

ヒストンは長年、クロマチンを構成するための構造タンパクとして働いていと見なされてきた。現在では、N末端（ヒストンテール）の化学修飾パター

ンがクロマチン構造を変化させ、遺伝子発現の制御を行っていることが分かっている。

ヒストンのアセチル化はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) により行なわれる。HAT はアミノ酸配列によりいくつかのファミリーに分類される。その多くは HAT 以外のタンパク質と複合体を形成して活性を示す。また、転写コアクチベーターの PCAF、CBP、p300 も HAT ファミリーとして知られている⁴⁶⁻⁴⁸。転写活性化因子が DNA の標的配列に結合すると、転写コアクチベーターがリクルートされ、周辺のヒストンがアセチル化される。これが引き金となってクロマチンリモデリング因子がリクルートされ、これらの因子は ATP の加水分解エネルギーを用いてヌクレオソーム構造を、DNA のヒストンへの巻きつきが緩まったユークロマチン状態へ変化させる。そして、基本転写因子と RNA ポリメラーゼによる転写が開始する (Figure 1-2)。

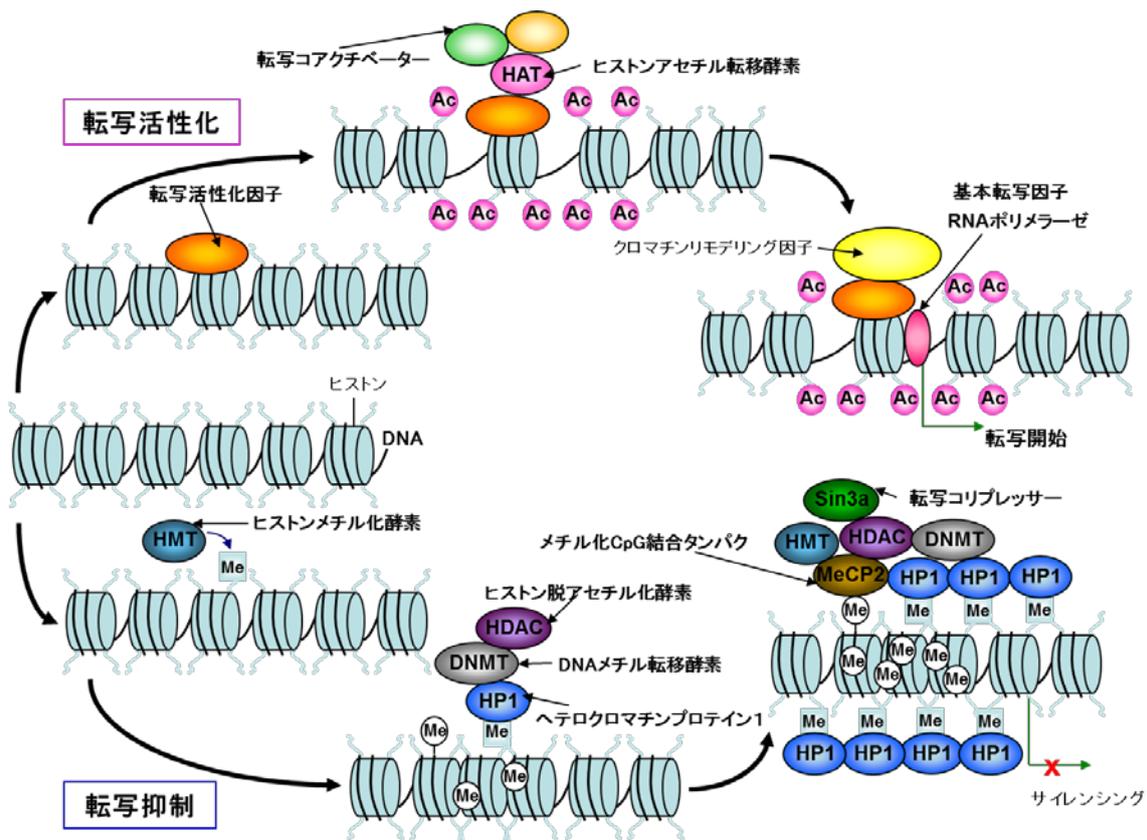
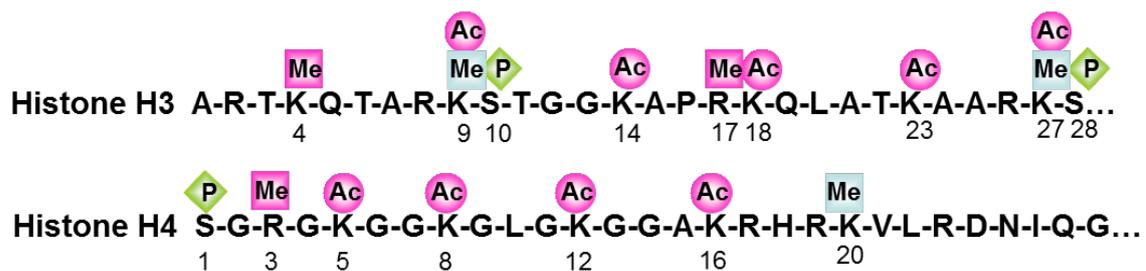


Figure1-2. エピゲノム変化と遺伝子調節機構

ヒストンはアセチル化以外にもメチル化・リン酸化などの化学修飾を受け、転写抑制・クロマチン凝縮に関与することが知られている。どのヒストンのアミノ酸残基が、どのような修飾を受けているかの組み合わせにより様々な細胞機能が発揮されると考えられている。ヒストン、アミノ酸残基および修飾の種類 of 三者の組み合わせが一種の暗号のようにになっていることから、このような考え方は「ヒストン暗号仮説」あるいは「ヒストン暗号モデル」と呼ばれる (Figure 1-3)。



Me: methylation, Ac: acetylation, P: phosphorylation

Figure 1-3. ヒストン暗号仮説。ヒストン暗号仮説はヒストンテールの修飾が機能的タンパク結合部位に成り得るといふ仮説である。ヒストンの N 末端はアセチル化、メチル化、リン酸化などのような修飾を受ける。

ピンク色のマークは遺伝子活性化の修飾、水色のマークは遺伝子不活性化の修飾を示す。ヒストン H3 セリン 10 のリン酸化は細胞分裂間期において遺伝子活性化、ヒストン H3 セリン 28 のリン酸化は細胞分裂 M 期における染色体分配と染色体凝縮、ヒストン H4 セリン 1 のリン酸化は精子形成時のクロマチン圧縮や、DNA 損傷応答に関与するとされている。

ヒストンはヒストンメチル化酵素 (HMT) によってメチル化される。現在、説明がもっとも進んでいるのはヒストン H3K9 のメチル化である。メチル化されたヒストン H3K9 をヘテロクロマチンプロテイン 1 (HP1) が認識して結合する。HP1 は DNA メチル化酵素やヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) をリクルートする。また HP1 同士が集合化することで、ヌクレオソーム構造がクロマチンの凝集したヘテロクロマチン状態になり、遺伝子のサイレンシングを引き起こす (Figure 1-2)。

DNA がメチル化する部位は多くの真核生物では CpG ジヌクレオチドのシトシンの 5 位炭素原子である。DNA をメチル化する酵素として、哺乳類では 5 種類の DNA メチル基転移酵素 (DNMT) が単離同定されているが、そのうち

メチル化酵素活性が認められているものは、DNMT 1、DNMT 3a、DNMT 3b の 3種類である。DNMT 1はDNA合成期のメチル化の維持に関わっている。DNMT 3a及びDNMT 3bは *de novo* メチル化に関わっている⁴⁹。プロモーター領域に存在する、転写因子が結合するモチーフがメチル化されると、Sp1など一部の転写因子を除くほとんどの転写因子はDNAに結合できなくなるため、転写は抑制される⁵⁰。また、メチル化されたDNAを特異的に認識して結合するタンパク質としてMBD1、MBD2、MBD3、MBD4及びMeCP2が知られている。これらはメチル化CpGに結合し、HDACや転写コリプレッサーのSin3aと複合体を形成することで、ヒストンの脱アセチル化を介して転写を抑制する。さらにヒストンH3K9のメチル化が引き金になりDNAメチル化酵素がリクルートされ、DNAのメチル化が誘導されることも分かっている。

このように、エピゲノム変化を担うDNAメチル化やヒストン修飾等の機構は相互に協調して、遺伝子発現の制御を行っている。

1.3. メタロチオネインの生理的役割

メタロチオネイン (Metallothionein : MT) は、1957年にMargoshesとValleeによってウマの腎皮質からカドミウム (Cd) 結合タンパクとして分離精製された⁵¹。哺乳類のみならず鳥類・爬虫類・両生類・無脊椎動物など、これまでに

調べられた動物種全てに存在することが知られている。構造が類似したタンパク質は、植物、真核微生物、原核生物に至る生物種に存在することが確認されている⁵²。哺乳動物では少なくとも MT1 と MT2 の 2 種の亜型が存在すること、ヒトやマウスでは MT3 と MT4 を含めた 4 種の亜型が存在することが確認されている。これらの亜型はいずれも構成アミノ酸のうち 20 個をシステインが占め⁵³、しかも S-S 結合を 1 つも持たず、チロシンなどの芳香族アミノ酸やヒスチジンを含まない、熱や酸に安定な低分子量タンパク質（分子量：約 7000）である^{54,55}。MT1 及び 2 は重金属類を結合することにより無毒化することで重金属毒性軽減作用を示す⁵⁶⁻⁶⁰。さらに、重金属蓄積^{61,62}、Zn や Cu の代謝調節、これらの金属の他のタンパク質への供給⁶³⁻⁶⁵、抗酸化・抗炎症作用⁶⁶⁻⁶⁸、細胞増殖・分化⁶⁹、など様々な生理的役割を果たしている。また、MT1/2 ノックアウトマウスにおいて DMBA による皮膚がんの増悪化^{70,71}、あるいは BBN による膀胱がん⁷²の増悪化が認められることや、高脂肪食を与えられた MT1/2 ノックアウトマウスが体内の白色脂肪が増加することで肥満になる⁷³という報告もあり、MT と疾患との関連が注目されている。

1.4. メタロチオネイン誘導と転写調節機構

MT1 及び 2 の生合成は、様々な要因によって誘導される。Cd、Zn、Hg、Au、

Ag、Bi は MT1/2 を誘導し、かつ生体内で MT1/2 と結合する⁷⁴。金属以外でも、グルココルチコイド^{75,76}、サイトカイン^{77,78}、ビタミン⁷⁹、発がん促進剤⁸⁰、エンドトキシン⁸¹、アルキル化剤⁸²、農薬⁸³など様々な物質に加え、拘束ストレス⁸⁴や放射線照射⁸⁵などによっても MT1/2 の誘導が起こる。

MT1/2 はほとんどの組織で発現が認められ、その遺伝子発現は転写レベルで制御されている。金属による MT1/2 転写を担う転写因子は metal responsive element binding transcription factor 1 (MTF1) である。MTF1 は MT1/2 プロモーター領域の金属応答配列 (MRE : metal responsive element) に結合し、MT1/2 の転写活性化を行うと考えられている⁸⁶。MRE の他にも、antioxidant responsive element (ARE) が存在し、抗酸化酵素や異物代謝酵素の遺伝子誘導の転写因子と知られている Nrf1 や Nrf2 が ARE に結合し MT1 を転写活性化する⁸⁷。また、グルココルチコイドレセプターが結合する GRE⁸⁸、STAT 転写因子群が結合する IL-6RE⁸⁹があり、このような MT1 プロモーターにおける多種多様のシスエレメントの存在は、様々な要因によって誘導される MT の性質を反映しているといえる。

これまでに金属曝露時の MTF1 による MT1 の転写調節機構が詳細に検討されている。MTF1 のタンパク質の構造として最も特徴的な点は典型的な C₂H₂ タイプの Zn フィンガーモチーフを連続して 6 個有することである。また、Zn

フィンガーの C 末側には酸性アミノ酸領域、プロリンが豊富な領域ならびにセリン・スレオニンが豊富な領域の 3 つの転写活性化ドメインがある⁹⁰ (Figure 1-4)。

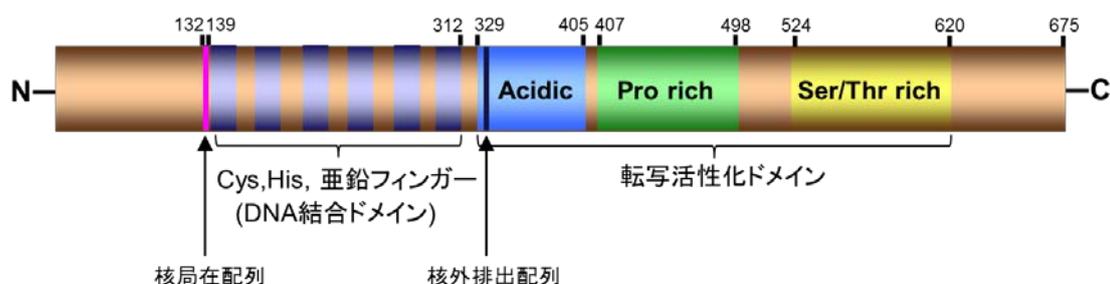


Figure 1-4 MTF1 のドメイン構造

MTF1 は Zn 依存的に細胞質から核内へと移行し、MT 遺伝子プロモーターの MRE に結合することで転写活性化を促進するとされている。近年、MTF1 が HAT の 1 種である p300、基本転写因子である Sp1 を MT1 プロモーターの MRE へリクルートし、転写活性化することが報告されている⁹¹。重金属による MT の転写誘導には MTF1 は必須であることは、MTF1 ノックアウト細胞では重金属による MT の誘導が認められないという実験によって証明されている⁹²。しかし、*in vitro* 実験においては、MTF1 は Zn 依存的に MRE に結合するが、Cd、Cu、Hg のような他の MT 誘導金属では MRE への結合を誘導できないことが示されている⁹³⁻⁹⁵。様々な重金属を曝露した際に MTF1 を介してどのように MT 遺伝子の発現調節がなされるかのメカニズムは未だ解明されていない。現在最も支持されている仮説は、すべての重金属類のシグナルは Zn のシグナルに変

換されるという“Zn シグナル説”である⁹⁶。これは、Cd などの重金属が細胞内のタンパクに結合している Zn と置換され、その結果増加した遊離 Zn 濃度を MTF1 が感知するという考えである。しかし、MT 遺伝子の転写活性化を引き起こす Cd 濃度が 10 μM 程度であるのに対し、Zn では 100 μM 以上の濃度を必要とするため、化学量論的には説明しにくいという問題がある。しかし近年、As が MTF1 の C 末端側のシステインクラスターに結合することで、MT1 の転写活性化を調節する⁹⁷という報告があり、重金属が直接的に MTF1 の転写活性化に関与する可能性も示唆されている。今後、重金属曝露時の MT 遺伝子転写調節の詳細な分子メカニズムの解明が期待される (Figure 1-5)。

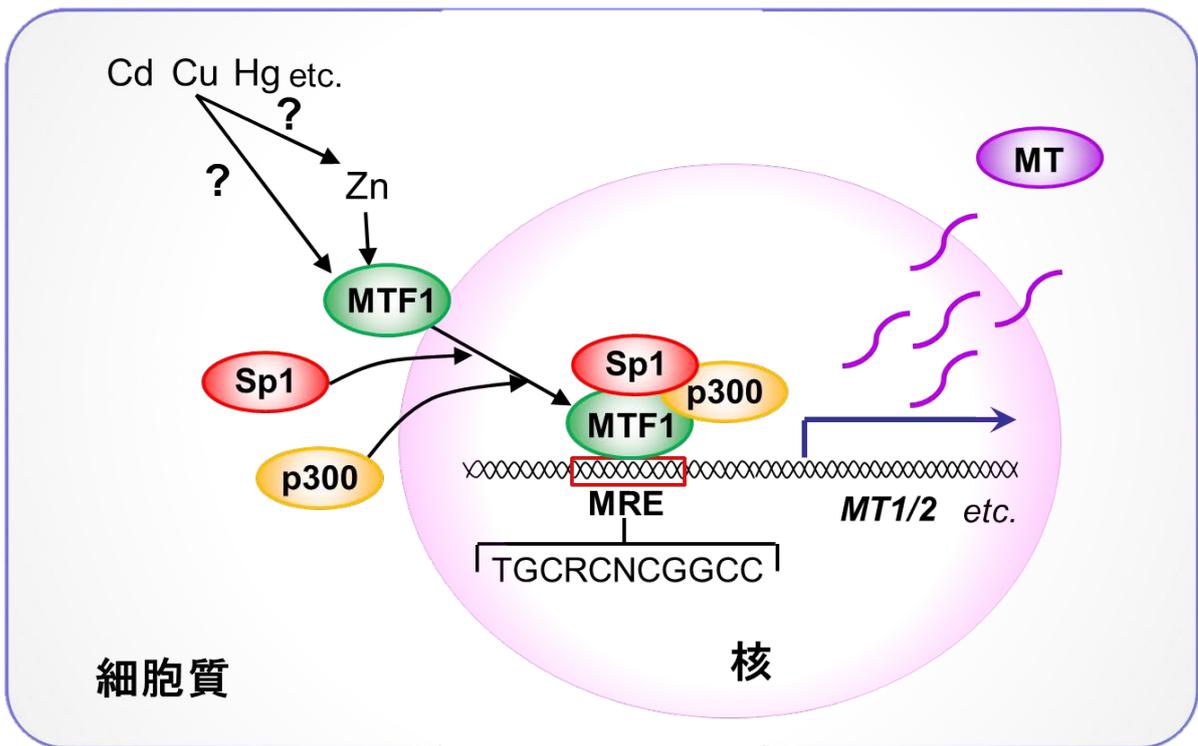


Figure 1-5. MTF1 を介した MT1/2 遺伝子の転写活性化モデル

亜鉛、重金属のシグナルによって MT1/2 遺伝子プロモーターの MRE へ MTF1 が結合し MT の誘導が起きる。MTF1 は亜鉛センサーであり、重金属からのシグナルが細胞内の遊離亜鉛濃度を上昇させ、亜鉛シグナルへと変換されることで MTF1 が活性化されると考えられているが詳細は明らかではない。

1.5. 本研究の目的

以上から、私は、胎生期や幼若期の低亜鉛環境がエピゲノム変化を誘発し、成人後の疾患発症や健康状態を決定づけるという仮説を立て、これを実証することを博士論文のテーマとして行うことにした。

そこで本研究では、重金属毒性軽減、亜鉛の恒常性維持などに重要な役割を担っているメタロチオネイン遺伝子に焦点を当て、胎生期低亜鉛環境が実際に仔へのエピゲノムを変化させるのかマウスを用いて解析を行った。

上記を証明するために以下に示す3つの動物実験を行った。

1) 胎生期低亜鉛環境で育った5週齢仔マウスにおけるエピゲノム解析

胎生期低亜鉛環境によって成熟後の仔マウスでエピゲノム変化が引き起こされるかを検討する。

2) 胎生期低亜鉛環境で育った出生直後の仔マウスにおけるエピゲノム解析

上記1)の実験で捉えられたエピゲノム変化がいつ引き起こされるかを解析する。

3) 成獣マウスを用いた低亜鉛負荷が引き起こすエピゲノム解析

上記1) 2)の胎生期低亜鉛実験と比較することで、低亜鉛環境によるエピゲノム変化が胎生期特異的に引き起こされるかを検討する。

第2章 方法

2.1. 動物

C57BL/6J マウスは日本クレア (CLEA Japan, Inc. Tokyo, Japan) から購入した。固形飼料 (ラボ MR ストック) (NOSAN, Yokohama, Japan) 及び水は自由飲水させ、明暗周期 12 時間、室温 23°C の環境で飼育した。

2.2. 細胞株

マウス肝がん細胞株の Hepa1c1c7 は American Type Culture Collection から購入した。培養用培地は、10% FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA)、100 U/mL Penicillin/0.01% Streptomycin (Invitrogen)、0.01% Sodium Pyruvate (Invitrogen)、0.03% L-glutamine (Invitrogen)、55 μ M 2-mercaptethanol (Invitrogen) を含む DMEM (Invitrogen) を使用した。細胞は 37°C、5% CO₂ の条件下で培養し、対数増殖期に PBS で洗浄し、0.5% Trypsin-EDTA (Invitrogen) で継代した。

2.3. 胎生期低亜鉛実験 (生後5週齢)

妊娠 C57BL/6J マウスを2群に分け、先行報告の Beach らの実験 (胎生期低亜鉛食 (Zn 5ppm) を妊娠7日目から分娩時まで与えられた母マウスから生まれた仔マウスにおいて、免疫機能低下⁴⁴ および MT タンパクの誘導能増強⁴⁵ が認められる) をモデルとして、妊娠8日目から分娩時まで低亜鉛食 (Zn 5 ppm) (CLEA Japan) 及び 対照食 (Zn 35 ppm) (CLEA Japan) を自由摂取させた。低亜鉛食と対照食の組成を Table 2-1A~C に示す。

Table 2-1A Composition of diets given to dams during pregnancy

	Control diet	Low-Zn diet
Milk Casein	24.5%	24.5%
Cornstarch	45.5%	45.5%
Granulated Sugar	10.0%	10.0%
Corn Oil	6.0%	6.0%
Crystalline Cellulose	3.0%	3.0%
Cellulose Powder	2.0%	2.0%
α -Starch	1.0%	1.0%
CLEA Vitamin Mix [#]	1.0%	1.0%
CLEA Mineral Mix [*]	7.0%	7.0%

[#] Refer to Table 2-1B for composition

^{*} Refer to Table 2-1C for composition

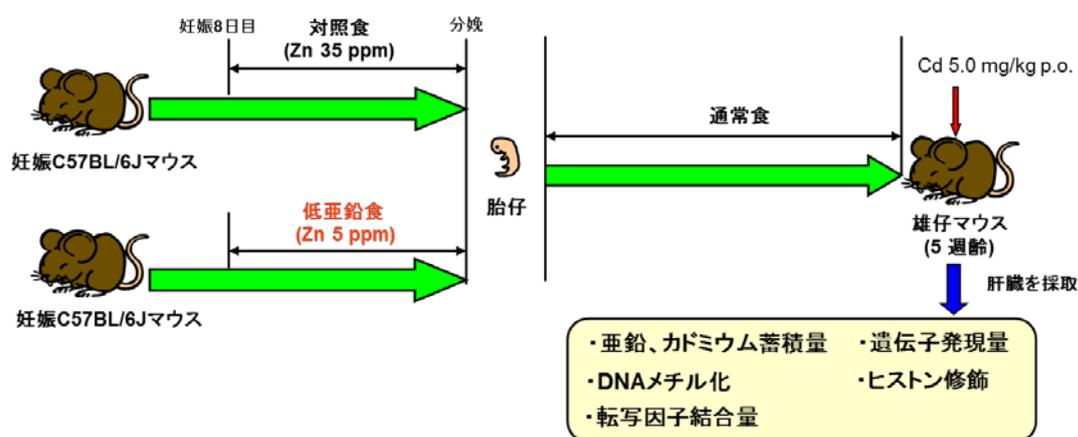
Table 2-1B Vitamin composition of diets given to dams during pregnancy

	CLEA Vitamin Mix (mg/100 g diet)
Vitamin A, D ₃ (V.A 5×10^5 IU/g, V.D ₃ 1×10^5 IU/g)	2.4
Vitamin E (50%)	20.0
Vitamin K ₃	0.3
Vitamin B ₁	1.5
Vitamin B ₂	1.56
Vitamin B ₆	1.02
Biotin (2%)	0.5
Calcium Pantothenate	4.0
p-Aminobenzoic Acid	10.15
Niacin	10.15
Inositol	15.0
Folic Acid	0.2
Choline Chloride	300.0
Vitamin B ₁₂ (0.1%)	5.0
Cornstarch	628.22

Table 2-1C Mineral composition of diets given to dams during pregnancy

	CLEA Mineral Mix (mg/100 g diet)	CLEA Mineral Mix for low-Zinc diet (mg/100 g diet)
CaCO ₃	1355.4	1355.4
KH ₂ PO ₄	1730.0	1730.0
CaHPO ₄ · 2H ₂ O	1500.0	1500.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	800.0	800.0
NaCl	600.0	600.0
FeC ₈ H ₅ O ₇ · 5H ₂ O	190.0	190.0
2ZnCO ₃ · 3Zn(OH) ₂ · H ₂ O	6.0	0.85
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.26	1.26
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.4	0.4
Ca(IO ₃) ₂	1.54	1.54
MnSO ₄ · 4H ₂ O	15.4	15.4
Cornstarch	628.22	628.22

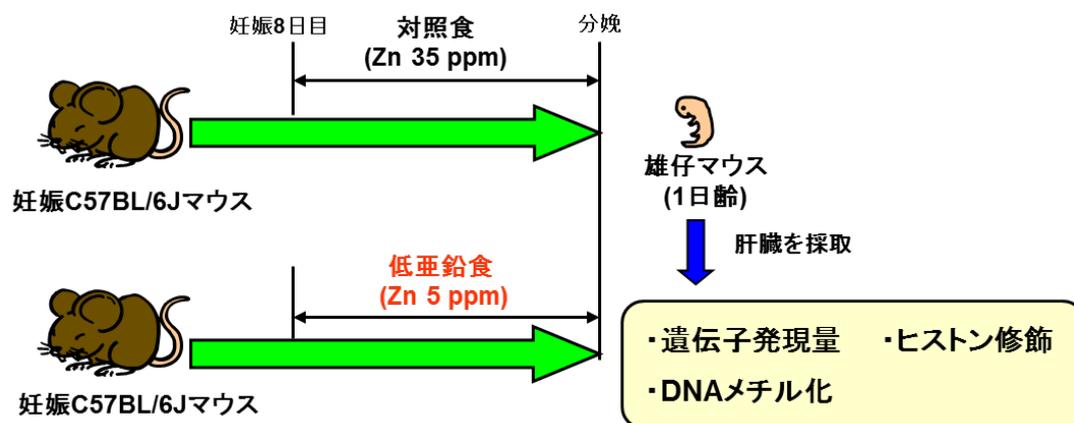
出生後、産仔数を1腹あたり6匹に揃え、分娩ならびに離乳以降、両群とも通常固形飼料（ラボMRストック）で飼育した。その後、5週齢の雄仔マウスにCd 5.0 mg/kg（CdCl₂ 2.5H₂O（Wako, Osaka, Japan）で調製）を単回経口投与した。投与後6時間で肝臓を採取し、肝臓中Zn, Cd蓄積量、遺伝子発現量、タンパク発現量、DNAメチル化、ヒストン修飾ならびに転写因子結合量の解析を行った。以下に実験のスケジュールを示す。



2.4. 胎生期低亜鉛実験 (生後1日齢)

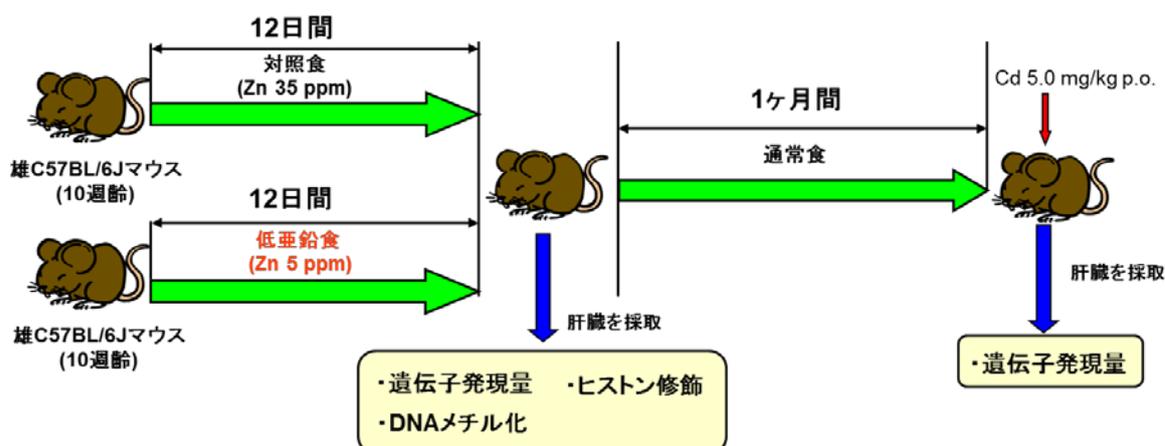
妊娠 C57BL/6J マウスを2群に分け、妊娠8日目から分娩時まで低亜鉛食 (Zn 5 ppm) 及び 対照食 (Zn 35 ppm) を自由摂取させた。生後1日目の雄性マウスの肝臓を採取し、遺伝子発現量、DNA メチル化、ヒストン修飾解析を行った。

以下に実験のスケジュールを示す。



2.5. 成獣マウス低亜鉛実験

10週齢雄 C57BL/6J マウスを2群に分け、12日間低亜鉛食(Zn 5 ppm)及び対照食(Zn 35 ppm)を自由摂取させた。低亜鉛食を12日間与えた時点で数匹の肝臓を採取し、遺伝子発現量、DNAメチル化、ヒストン修飾解析を行った。残りのマウスは12日間の低亜鉛食摂取後、1ヶ月間通常食で飼育しCd 5.0 mg/kgを単回経口投与した。投与後6時間において肝臓を採取し遺伝子発現量解析を行った。以下に実験のスケジュールを示す。



2.6. Hepa1c1c7 を用いた Cd 曝露による遺伝子発現量測定

6 well プレートに 4.4×10^5 個/well で細胞を撒いた。培養液に Cd を 5.0 μ M で添加し、0、1、3、6、12、24 時間後にトータル RNA を回収して、定量 RT-PCR で遺伝子発現解析を行った。

2.7. 肝臓中金属含有量測定

下記に従って肝臓を湿式灰化後、Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS) (Agilent Technologies) を用いて測定した。

試験管に肝臓 0.1 g を秤量し、硝酸 (Wako) を 1.0 mL 加えてフロンボールをのせ、1 晩静置した。その後、試験管をホットプレートに移し下記のように徐々に温度を上げて加熱した。

80°C 1 時間 → 90°C 1 時間 → 100°C 1 時間 → 110°C 1 時間

さらに 120~130°C で硝酸が少し残留するまで加熱後、特級水で 5.0 mL までメスアップし、さらに特級水で 100 倍希釈し、Minisart SRP 15 (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) を用いて濾過後 ICP-MS で Zn、Cd 濃度を測定した。

2.8. DNA 抽出

マウス肝臓から ISOGEN (Wako) を用いて DNA を抽出した。抽出後、フェノール/クロロホルム抽出法を用いて DNA を精製した。

2.9. RNA 抽出

マウス肝臓および Hepa1c1c7 から RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて Total RNA を抽出した。

2.10. レポーター遺伝子コンストラクトの作成

DNA 100 ng を鋳型として *Kpn* I および *Xho* I 制限酵素サイトを含むプライマーを用い、LA taq (TaKaRa Bio, Otsu, Japan) によってマウス MT2 遺伝子プロモーター領域を以下の条件下でサーマルサイクラー (GeneAmp[®] PCR System9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて増幅した。

```
denature   : 95°C  1:00
↓
denature   : 95°C  0:30
annealing  : 60°C  1:00
extension  : 72°C  2:00 ] × 30 cycle
↓
extension  : 72°C 10:00
↓
cooling    : 4°C   ∞
```

増幅した PCR 産物を pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA) にサブクローニングした。サブクローニングした pGEM-T Easy Vector を *Kpn* I (New England BioLabs Inc. Ipswich, MA, USA) ならびに *Xho* I (TOYOBO, Osaka, Japan)

で制限酵素処理後、アガロース電気泳動で分離し、MT2 プロモーターを含む断片を Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いてゲルから切り出し精製した。精製した断片を、pGL4.0 Luciferase Reporter Vector (Promega) にサブクローニングし MT2 プロモーターレポーターコンストラクトを作成した。次に上記の MT2 プロモーターレポーター-pGL4 プラスミドを鋳型とし、種々のデリーションコンストラクト用プライマーを用い、KOD -Plus- (TOYOBO) によるインバース PCR 法で以下の条件下でプラスミド全周を増幅した。

```

denature   : 94°C 2:00
↓
denature   : 98°C 0:10
extension  : 68°C 7:00  } × 10 cycle
↓
cooling    : 4°C ∞

```

増幅後、残った鋳型は *Dpn* I (New England BioLabs Inc) を用いて分解し、PCR 産物は T4 Polynucleotide Kinase (TaKaRa Bio) を用いて 5'末端をリン酸化した。リン酸化した PCR 産物を Ligation convenience Kit (Wako) でセルフライゲーション後、大腸菌 DH5 α (TOYOBO) にトランスフォーメーションさせ、サブクローニングすることでデリーションコンストラクトを作成した。作成に使用したプライマー配列は Table 2-2 に示す。

Table 2-2 Sequence of primers for reporter constructs

Construct Name		Primer Sequence (5' → 3')
pGL4 MT2 Promoter	Forward	TTCAGGTACCAGGCAAAGAAGGAAGAAGTACCCCA
	Reverse	AGATCTCGAGAGCGCGACCTTTATAGCGGA
pGL4 MT2 Δ-397 ~ -37	Forward	TCCGCTATAAAGGTCGCGCT
	Reverse	TGCTGAGCGACGAGACCTCT
pGL4 MT2 Δ-2166 ~ -397	Forward	TCGCCTCTGCACCCGGCCCCCT
	Reverse	GGTACCGGCCAGTTAGGCCAG
pGL4 MT2 Δ-2166 ~ -307	Forward	TCGCAGACCCTTTGCGCTCA
	Reverse	GGTACCGGCCAGTTAGGCCAG
pGL4 MT2 Δ-2166 ~ -287	Forward	GCTCCTTTGCTCTCAGTCCC
	Reverse	GGTACCGGCCAGTTAGGCCAG
pGL4 MT2 Δ-2166 ~ -65	Forward	CGGAGCTTTTTCGCTCGACCCAAT
	Reverse	GGTACCGGCCAGTTAGGCCAG
pGL4 MT2 Δ-2166 ~ -37	Forward	TCCGCTATAAAGGTCGCGCT
	Reverse	GGTACCGGCCAGTTAGGCCAG

2.11. デュアルレポーターアッセイを用いたMT2 プロモーターの転写調節機能の解析

48 well プレートに細胞を 4.4×10^5 個/well で撒き、種々のレポーターコンストラクトと phRL-TK ベクター (Promega) を Lipofectamine2000 (Invitrogen) により細胞にコトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後、培地を取り除き、Cd 0、5.0、10.0 μM で 24 時間曝露を行った。曝露後、細胞を回収し Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) を用いてデュアルレポーターアッセイを行った。

2.12. 定量 RT-PCR 法を用いた遺伝子発現量解析

PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa Bio) のプロトコルに従って、Total RNA 500 ng を cDNA に逆転写し、TE で 4 倍希釈した。Light Cycler Capillary (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) 1 本あたり、サンプル溶液 4.0 μL 、SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (TaKaRa Bio) 10.0 μL 、PCR Forward and Reverse Primers (5 μM each) 0.8 μL 、dH₂O 5.2 μL 合計 20.0 μL の反応液を調整し、LightCycler[®] (Roche Molecular Biochemicals) で以下の条件下でリアルタイム RT-PCR を行った。

```
denature : 95°C 0:10
↓
denature : 95°C 0:05
annealing and extension : 60°C 0:30 ] × 45 cycle
↓
melting curve analysis
```

あるいは、1 well あたり、サンプル溶液 2.0 μL 、LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche Molecular Biochemicals) 5.0 μL 、PCR Forward and Reverse Primers (5 μM each) 0.4 μL 、dH₂O 2.6 μL 合計 10.0 μL の反応液を調整し LightCycler[®] 480 で以下の条件で測定した。

```
denature : 95°C 5:00
↓
denature : 95°C 0:15
annealing : 60°C 0:10
extension : 72°C 0:30 ] × 45 cycle
↓
melting curve analysis
```

リアルタイム RT-PCR の解析によるコピー数算定は、当研究室の定法⁹⁸に従って実施した。使用したプライマー配列を Table 2-3 に示す。

Table 2-3 Sequence of primers for Real time RT-PCR

Gene Name		Primer Sequence (5' → 3')
MT1	Forward	TTCACCAGATCTCGGAATGG
	Reverse	GAGGTGCACTTGCAGTTCTTG
MT2	Forward	CCTGCAAATGCAAACAATGC
	Reverse	CACTTGTCGGAAGCCTCTTTG
MTF1	Forward	TTGACTATAAACCCCTGGTTCCACAC
	Reverse	ACCGCTTTACTTCTTTCCGTTTC

2.13. Bisulfite Sequencing 法による DNA メチル化解析

Bisulfite 法の原理を以下に示す。一本鎖 DNA を重亜炭酸ナトリウム (sodium bisulfite) で処理すると、非メチル化シトシンではシトシン環の 6 位にスルホン酸が付き、さらに 4 位の脱アミノ化が起こる。続くアルカリ処理による加水分解でスルホン酸を除去してウラシルに変換する (Figure 2-1)。5-メチルシトシンはバイサルファイトへの反応性がきわめて低いのでそのまま残る。この DNA を鋳型として調べたい領域を PCR で増幅後、クローニングして配列を決定すると、5-メチルシトシンはシトシンとして、非メチル化シトシンはチミンとして増幅するので、メチル化状態を知ることができる (Figure 2-2)。

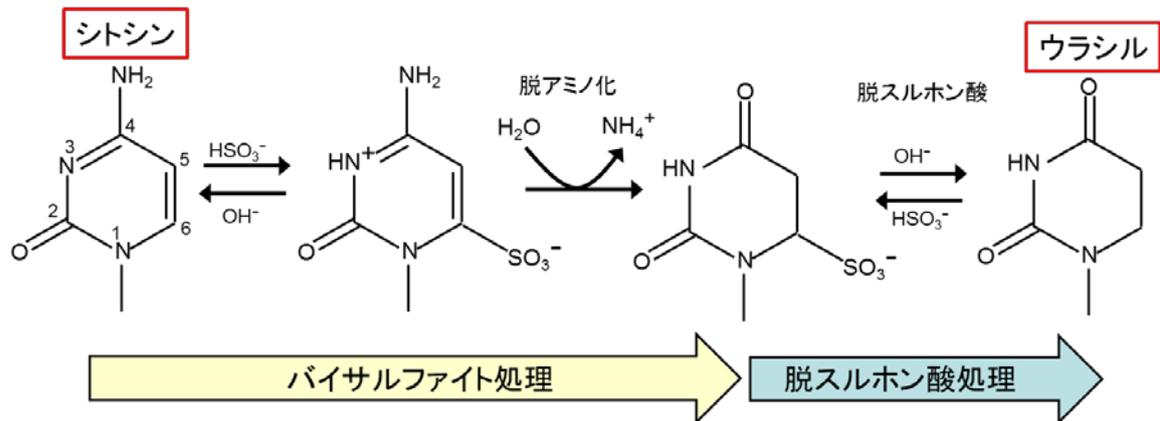


Figure 2-1. バイサルファイト処理によるシトシンのウラシルへの変換
 (エピジェネティクス実験プロトコール 羊土社 より改変)

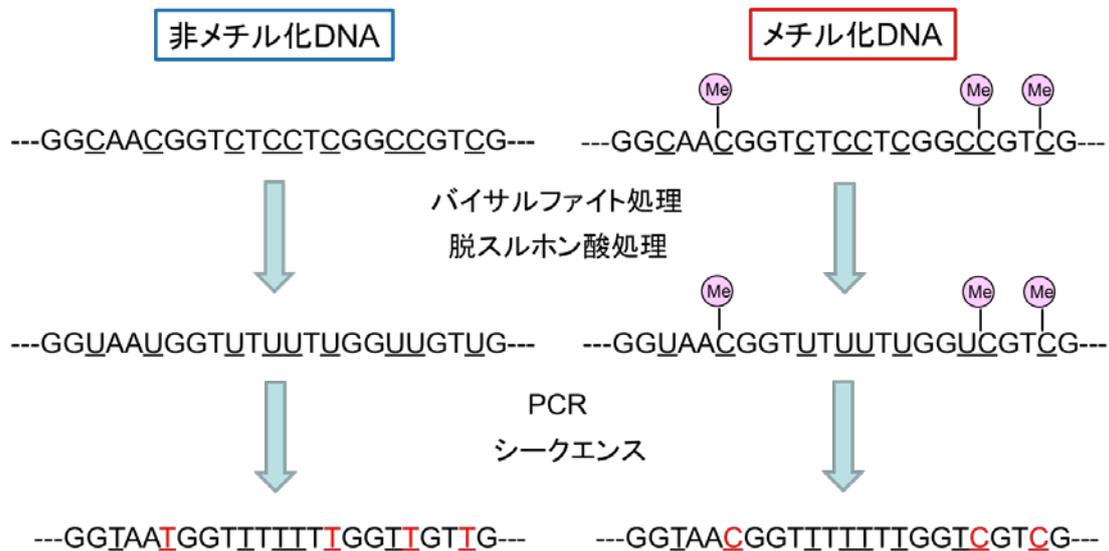


Figure 2-2. シークエンシングによるメチル化状態の比較
 (エピジェネティクス実験プロトコール 羊土社 より改変)

次に Bisulfite Sequencing 法の手順を以下に示す。DNA 1.0 μg を用いて、既報のプロトコルに準じて行った⁹⁹。Not I (TOYOBO) 処理により DNA を断片化し、水酸化ナトリウム (Wako) によって DNA を一本鎖にした。Sodium metabisulfite (Sigma, St Louis, MO, USA) でスルホン化させ、Wizard DNA Clean-Up system

(Promega) を用いて遊離の亜硫酸水素を除去した。水酸化ナトリウムによる加水分解によって脱アミノ化させ、Ammonium acetate (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) によるアルカリによって脱スルホン化させ、非メチル化シトシンをウラシルに変換した。Bisulfite 処理をした DNA は Nested PCR 法で増幅させた。以下に PCR 条件、増幅した領域を Figure 2-3、使用したプライマー配列を Table 2-4 に示す。

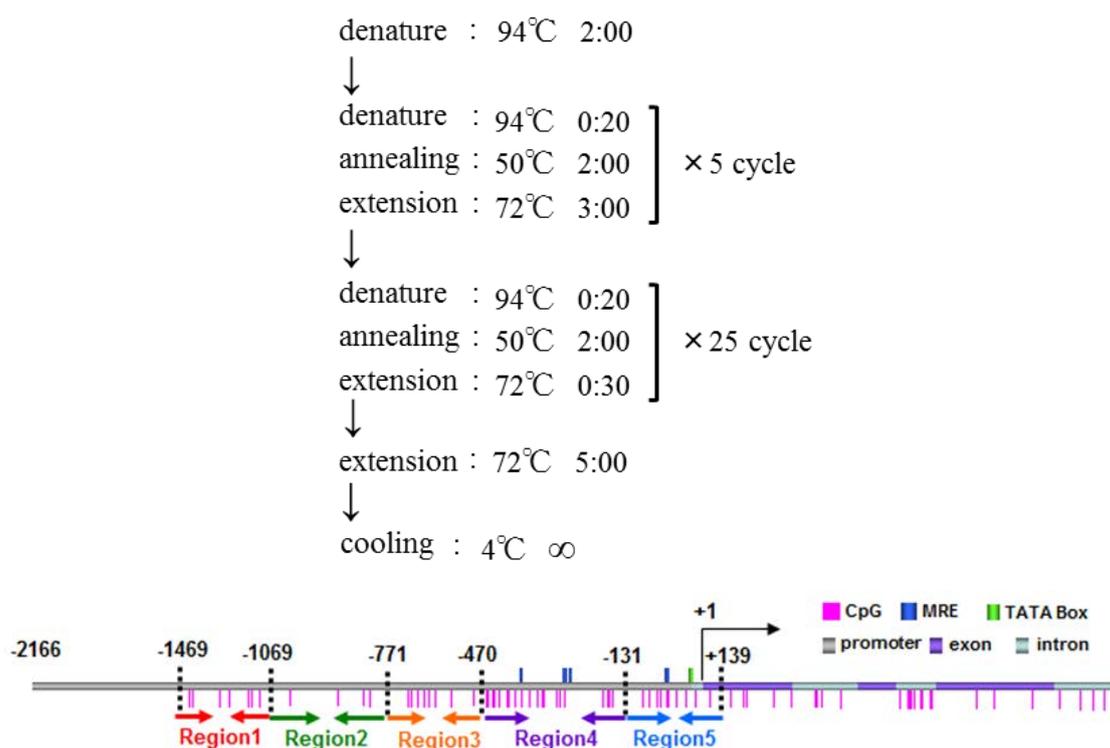


Figure 2-3. Bisulfite Sequencing で解析した MT2 の遺伝子領域
 それぞれの Region における Nested PCR のプライマー配列は Table 2-4 を参照。

Table 2-4 Sequence of primers for Nested PCR

Region Name		Primer Sequence (5' → 3')	
MT2 BS-Region1	First PCR	Forward	TATTTTGGTTTGAGGTTGGAGTT
		Reverse	CCCCACTTACTTAAATCTACTAAAATC
	Second PCR	Forward	TTGGAGTTATAGTAAAGATTGTTTTG
		Reverse	TACTAAAATCAAACCTAAAATCATAACTAAAAT
MT2 BS-Region2	First PCR	Forward	TATTTTTAGGGGAAGAAATT
		Reverse	CAACCAATTATCAAAAAACTA
	Second PCR	Forward	GGAAGAAATTTTGGTTGTTATTTTTAT
		Reverse	CTAAAAACCATAAACACAAACCTTATA
MT2 BS-Region3	First PCR	Forward	GTGTGTTGGTTATATTTTTGAG
		Reverse	TAAAAAAAAAACCAAAAACCTATC
	Second PCR	Forward	ATTTTTGAGTTAGAAAAGGG
		Reverse	AAAAACCTATCTAACTCTCC
MT2 BS-Region4	First PCR	Forward	TTTGTGTTTATGGTTTTTAGT
		Reverse	CATATCTTATACTAACCTAAATAAA
	Second PCR	Forward	TAGTTTTTTGATAATTGGTTG
		Reverse	CTTATATACTAACCTAAATAAAAAC
MT2 BS-Region5	First PCR	Forward	GTTTTTATTTAGGTTAGTATATAAG
		Reverse	TAAAAACAACCTACCCTCTTT
	Second PCR	Forward	TTTATTTAGGTTAGTATATAAGATATG
		Reverse	TCAAAAAATATAACCAACACA

増幅させた DNA は PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製し、pGEM-T Easy Vector (Promega) にサブクローニングした。複数のコロニーをピックアップして、M13-forward、M13-reverse プライマーを用いて PCR により得た産物を Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行い、3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) で解析した。

2.14. Methylation sensitive 制限酵素を用いた DNA メチル化解析

精製した DNA 0.1 ~ 1.0 μg を用いて、*Bam* HI (New England BioLabs Inc) 処理後、Methylation sensitive 制限酵素 *Aci* I (New England BioLabs Inc) 処理を行った。*Aci* I の認識配列とプライマー増幅領域については Figure 2-4 に示した。*Aci* I 処理、未処理 DNA サンプルそれぞれを MT2 プロモーターの -877 ~ -688 の領域に対し、LightCycler[®]を用いて定量 PCR を行った。以下に PCR 条件、使用したプライマーを Table 2-5 に示す。

```
denature : 95°C 0:10
↓
denature : 95°C 0:05
annealing : 60°C 0:15
extension : 72°C 0:20 ] × 40 cycle
↓
melting curve analysis
```

Table 2-5 Sequence of primers for Methylation sensitive PCR

Region Name		Primer Sequence (5' → 3')
MT2 <i>Aci</i> I Region	Forward	TCCACCTCCAGCAAAGACC
	Reverse	AAACGGAGACGCAGTCACATAG

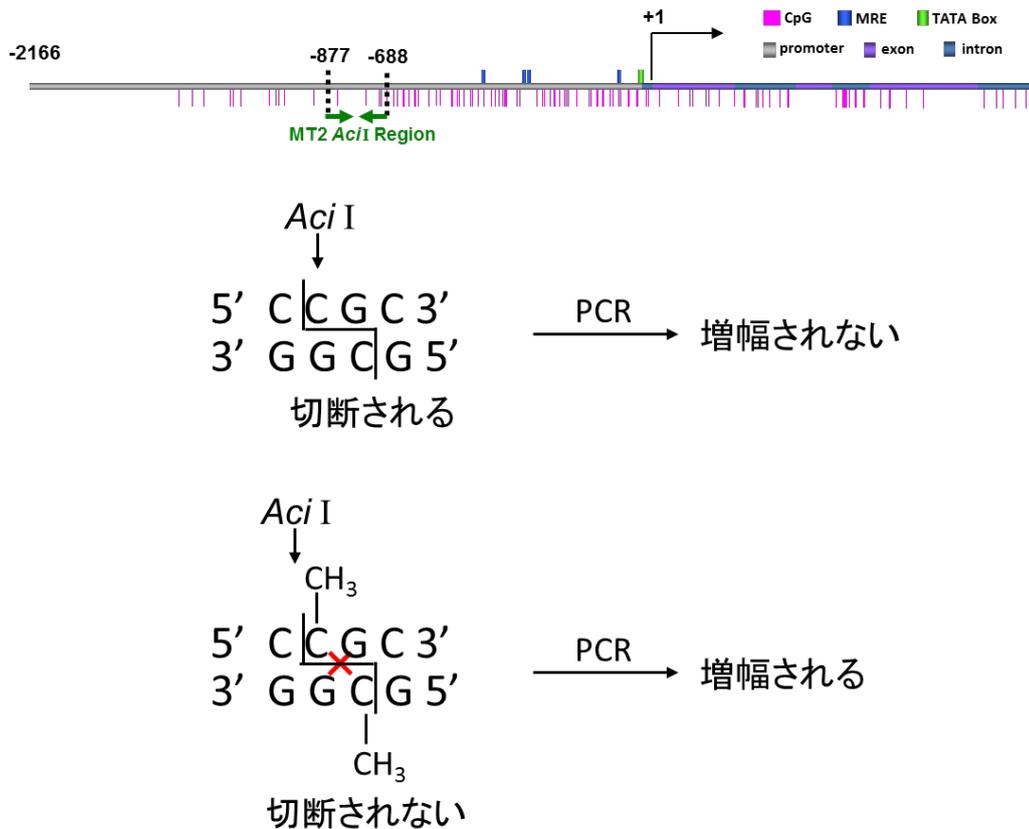


Figure 2-4. メチル化感受性酵素 *Aci I* の認識配列および解析した MT2 の遺伝子領域

2.15. ChIP qPCR

既報のプロトコル^{100,101}を参考にして、Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit (Upstate, Temecula, CA) のプロトコルを一部改変して行った。採取した肝臓を細分化し、1% Formaldehyde で固定した。その後 2.5M Glycine (Nacalai Tesque) を加え固定反応を停止し、ダウンスホモジナイザー (Wheaton, Millville, NJ) でホモジナイズし PBS で洗浄した。SDS Lysis Buffer (1% SDS (Nacalai Tesque)、10 mM EDTA (Nacalai Tesque)、5 mM Tris-HCl (Nacalai Tesque)) で

組織を溶解し、BIORUPTOR UCD-250HSA (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) を用いて出力 250W で ON : 30 sec – OFF : 105 sec を 20-24 cycle 繰り返して超音波破碎を行った。DNA が 100~1000 bp に断片化されていることをアガロースゲル電気泳動で確認した。30-75 μ L Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA (MilliPore, Billerica, MA, USA) をサンプルに加え、1 時間 4°C で回転攪拌し、Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA に非特異的に吸着する物質の除去を行った。ChIP Dilution Buffer (0.01% SDS、1.1% Triton X-100 (Nacalai Tesque)、1.2 mM EDTA、16.6 mM Tris-HCl、0.167 M NaCl (Nacalai Tesque)) で 4 倍希釈し、サンプルに抗体を加え、4°C で一晩回転攪拌した。使用した抗体については Table 2-6 に示した。

Table 2-6 Antibodies used for ChIP qPCR

Name	Company
AcH3	MilliPore
AcH4	MilliPore
AcH3K9	Cell Signaling Technology
AcH3K14	MilliPore
H3K4me3	Cell Signaling Technology
MTF1	Santa Cruz Biotechnology
IgG	

抗体反応後、Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA を加え、1 時間 4°C で回転攪拌し、Low Salt Immune Complex Wash Buffer (0.1% SDS、1% Triton X-100、2 mM EDTA、20 mM Tris-HCl、0.15 M NaCl)、High Salt Immune Complex Wash Buffer

(0.1% SDS、1% Triton X-100、20 mM Tris-HCl、0.5 M NaCl)、LiCl Immune Complex Wash Buffer (1% IGEPAL-CA630 (Wako)、1 mM EDTA、10 mM Tris-HCl、0.25 M LiCl (Wako)、1% Deoxycholic acid (Wako)) 1 回ずつ、TE 2 回の計 5 回洗淨し、elution buffer (1% SDS、0.1 M NaHCO₃ (Wako)、10 mM DTT (Sigma)) で溶出した。5 M NaCl によって脱クロスリンク反応を行い、RNaseA (Sigma) によって RNA を分解、Proteinase K (Nacalai Tesque) によってタンパク質を分解させ、PCR Purification Kit (Qiagen) で DNA を精製した。ChIP-DNA の定量化は以下の条件下で定量 PCR (LightCycler[®] または LightCycler[®]480) により行った。

[LightCycler[®] PCR 反応条件]

```
denature : 95°C 0:10
↓
denature : 95°C 0:05
annealing : 60°C 0:15
extension : 72°C 0:20 ] × 60 cycle
↓
melting curve analysis
```

[LightCycler[®]480 PCR 反応条件]

```
denature : 95°C 5:00
↓
denature : 95°C 0:15
annealing : 60°C 0:10
extension : 72°C 0:30 ] × 60 cycle
↓
melting curve analysis
```

PCR をかけた領域を Figure 2-5、使用したプライマーについては Table 2-7 に示した。抗体を加えていないサンプルを Input サンプルとし、脱クロスリンク反応から同様に処理を行った。

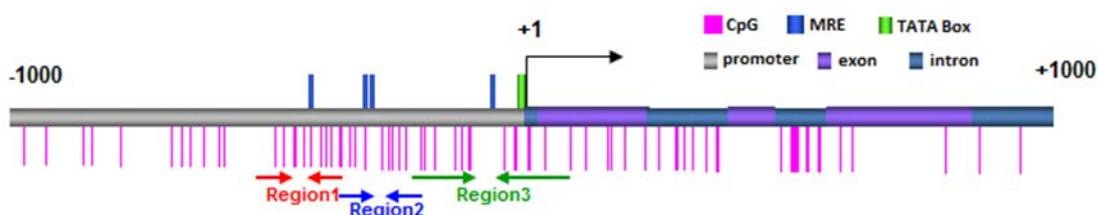


Figure 2-5. ChIP qPCR で解析した MT2 の遺伝子領域
 それぞれの Region における PCR のプライマー配列は Table 2-7 を参照。

Table 2-7 Sequence of primers for ChIP qPCR

Region Name		Primer Sequence (5' → 3')
MT2 ChIP Region1	Forward	ACAAGACATGCGCGGAAAC
	Reverse	TCCAGGACACCTGCTTGCT
MT2 ChIP Region2	Forward	GCAAGCAGGTGTCCTGGAA
	Reverse	CACGACCCGAATTCTGCAA
MT2 ChIP Region3	Forward	TTGCAGAATTCGGGTCGTG
	Reverse	GTTCTAGGAGCGTGATGGAGAGA

2.16. ウェスタンブロット法を用いたタンパク発現量解析

マウス肝臓から CellLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit (Sigma) のプロトコルに従い、核タンパクと細胞質タンパクを抽出した。それぞれのタンパク溶液の容量の 1/2 量の SDS Sample Buffer (62.5 mM Tris-HCl、10% Glycerol、2% SDS、0.5% 2-mercaptoethanol (Nacalai Tesque)、pH6.8) を加え、95°C で 5 分間加熱処理し変性させた。タンパク試料は 10% SDS-Polyacrylamide ゲルにて定電流 (30 mA) で 50 分電気泳動し、タンパク質を分離させた。電気泳動後の SDS-Polyacrylamide ゲルは 25 mM Tris、192 mM Glycine、20% Methanol (Wako)

溶液を含む転写溶液の中で Immobilon-P Transfer membrane (MilliPore) に対し定電圧 (50 V) で 2 時間転写した。転写後、メンブレンは MTF1 と β -actin 検出用には Blocking One (Nacalai Tesque)、LaminB 検出用には 5% BSA (Sigma) 溶液により室温で 1 時間処理しブロッキングを行った。1 次抗体は MTF1 と β -actin は Blocking One、LaminB は 5% BSA 溶液で種々の濃度に希釈 (MTF1 1:10000, LaminB 1:1000, β -actin 1:4000) し、上記メンブレンと 4°C で一晩抗体反応を行った。標的タンパクの検出には、MTF1 と β -actin 検出用には Blocking One、LaminB 検出用には 5% BSA 溶液で 5000 倍に希釈した 2 次抗体と室温で 1 時間抗体反応させ、Chemi-Lumi One (Nacalai Tesque) により化学発光させることで行った。

Table 2-8 に使用した 1 次抗体、2 次抗体の組み合わせを示す。

Table 2-8 Antibodies used for Western blot

Name	1 st antibody	2 nd antibody
MTF1	Rabbit polyclonal anti-MTF1 IgG (Santa Cruz Biotechnology)	ImmunoPure Goat Anti-Rabbit IgG, F(ab') ₂ , Peroxidase Conjugated (PIERCE Biotechnology, Inc.)
β -actin	Mouse monoclonal anti- β -actin IgG1 (SIGMA)	ImmunoPure Goat Anti-Mouse IgG, F(ab') ₂ , Peroxidase Conjugated (PIERCE Biotechnology, Inc.)
LaminB	Goat polyclonal anti-LaminB (Santa Cruz Biotechnology)	ImmunoPure Rabbit Anti-Goat IgG, F(ab') ₂ , Peroxidase Conjugated (PIERCE Biotechnology, Inc.)

2.17. 統計解析

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差で表示し、有意水準 $P < 0.05$ のとき、統計学的な有意差があるとした。統計解析は SPSS Ver. 15.0 J (SPSS Inc.) を用いた。

第3章 結果

3.1. 胎生期低亜鉛環境で生育した仔マウスの体重および亜鉛、カドミウム蓄積量

妊娠マウスに低亜鉛食 (Zn 5 ppm) および対照食 (Zn 35 ppm) を妊娠 8 日目から分娩時まで摂取させ、母マウス摂餌量、出生後の仔マウスの体重および肝臓中の亜鉛、カドミウム蓄積量を測定した。

母マウスの摂餌量は低亜鉛食群と対照食群との間に有意な差は認められなかった (Figure 3-1)。また、両群の母マウスから生まれた仔マウスを通常食で 5 週齢まで飼育した場合、1 日齢、27 日齢、5 週齢のいずれの時点においても両群の間で体重に有意な差は認められなかった (Table 3-1)。5 週齢において、肝臓重量に胎生期低亜鉛食群と対照食群との間に有意な差は認められなかった (Table 3-2)。肝臓中亜鉛蓄積量を ICP-MS で測定したところ、胎生期低亜鉛食群と対照食群との間に差は認められなかった。さらに、Cd 5.0 mg/kg 単回経口投与 6 時間後におけるカドミウム蓄積量も ICP-MS で測定したが、胎生期低亜鉛食群と対照食群との間で有意な差は認められなかった (Table 3-3)。以上の結果から、5 週齢において肝臓中の亜鉛レベルは両群間で変化がないことが確認でき、またカドミウム投与後の肝臓中カドミウム動態にも胎生期低亜鉛環境による影響はないことが示唆された。

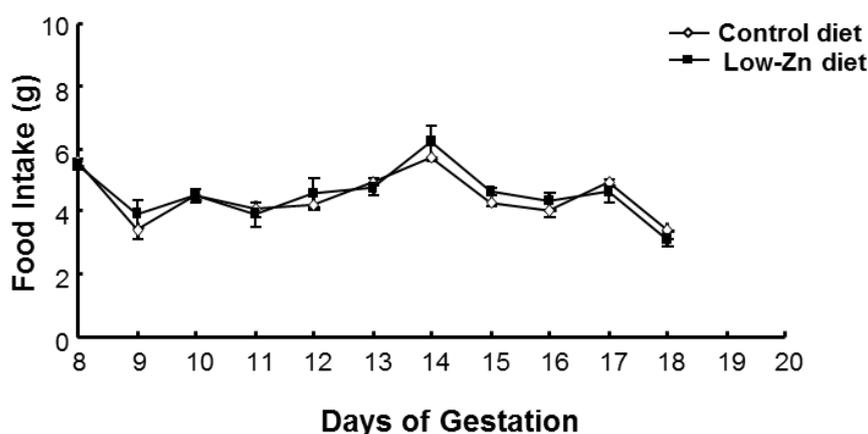


Figure 3-1. 母マウスにおける対照食と低亜鉛食の母マウス摂餌量の経時変化

妊娠 C57BL/6J マウスに妊娠 8 日目から分娩時まで低亜鉛食 (Zn 5 ppm) ならびに対照食 (Zn 35 ppm) を自由摂取させた時の母マウスの摂餌量変化を測定した (対照食群 n=5、低亜鉛食群 n=7、mean ± SEM)。

Table 3-1 胎生期低亜鉛食による仔マウスの体重変化

Experimental group	Body weight of pups (g)		
	PND1 (All pups)	PND27 (Male)	PND35 (Male)
Control diet	1.56 ± 0.03 (n=46)	11.76 ± 0.15 (n=12)	17.76 ± 0.45 (n=11)
Low-Zn diet	1.50 ± 0.03 (n=60)	13.17 ± 0.72 (n=23)	18.25 ± 0.38 (n=20)

妊娠 8 日目から分娩時まで低亜鉛食 (Zn 5 ppm) ならびに対照食 (Zn 35 ppm) を自由摂取させた母マウスから生まれた仔マウスの体重変化を測定した (mean ± SEM)。

Table 3-2 胎生期低亜鉛食による 5 週齢雄マウスの肝臓重量

Experimental group	Liver weight (g)
Control diet	0.99 ± 0.03 (n=11)
Low-Zn diet	0.97 ± 0.04 (n=20)

妊娠 8 日目から分娩時まで低亜鉛食 (Zn 5 ppm) ならびに対照食 (Zn 35 ppm) を自由摂取させた母マウスから生まれた 5 週齢仔マウスの肝臓重量を測定した (mean ± SEM)。

Table 3-3 胎生期低亜鉛食による 5 週齢雄マウス肝臓中の亜鉛、カドミウム蓄積量

Experimental group	Zn ($\mu\text{g/g tissue}$)		Cd ($\mu\text{g/g tissue}$)	
	Intact	Cd-exposed	Intact	Cd-exposed
Control diet	32.15 \pm 0.45 (n=5)	42.81 \pm 1.16 (n=6)	N.D. (n=5)	0.71 \pm 0.13 (n=6)
Low-Zn diet	32.62 \pm 0.51 (n=9)	42.12 \pm 0.75 (n=11)	N.D. (n=9)	0.89 \pm 0.11 (n=11)

胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウスに Cd 5.0 mg/kg を単回経口投与し、投与 6 時間後の肝臓中亜鉛、カドミウム蓄積量を測定した (mean \pm SEM)。

3.2. 胎生期低亜鉛環境で育った5週齢雄マウス肝臓中のMT1、MT2、MTF1遺伝子発現量

上記 3.1.で示した、胎生期低亜鉛環境で飼育した5週齢雄マウスにカドミウム曝露した時の肝臓中 MT1、MT2、MTF1 mRNA 発現量を定量 RT-PCR で測定した (Figure 3-2)。カドミウム曝露による MT1 mRNA 発現量は、胎生期低亜鉛食群において対照食群に比べて増加傾向にあったが有意な差は認められなかった (Figure 3-2A)。一方、MT2 mRNA 発現量は胎生期低亜鉛食群のほうが対照食群に比べ統計的に有意に誘導レベルが高いことがわかった (Figure 3-2B)。MT の主要な転写因子である MTF1 mRNA 発現量には胎生期低亜鉛食による変化は認められなかった (Figure 3-2C)。

前述 3.1.のように、この時点における肝臓中亜鉛、カドミウム蓄積量は胎生期低亜鉛環境による変化は認められなかったことから (Table 3-3)、胎生期低亜鉛環境で育ったマウスへのカドミウム曝露による MT2 遺伝子の発現上昇は肝臓中亜鉛及びカドミウム蓄積量の違いによるものではないと考えられる。

胎生期対照食で育ったカドミウム非曝露群と、胎生期対照食で育ったカドミウム曝露群間においてカドミウム曝露による mRNA 誘導が MT1 では有意に上昇したが、MT2 では若干の上昇傾向はあるものの有意な差は認められなかった (Figure 3-1A、B)。このことから、カドミウム曝露による転写レベルでの誘導

率は MT1 に比べて MT2 の方が遅いのではないかと考えられる。一方、胎生期低亜鉛食では、カドミウム曝露による MT2 の誘導率は対照食群と比べて速かった (Figure 3-1B)。したがって、胎生期低亜鉛食群では何らかの原因で MT2 mRNA が誘導され易く状態になっているために、カドミウムによる誘導が対照食群に比べ、より早い時間で引き起こされたと考えられる。MT1 と MT2 はタンパクとしての機能は同じであるが、今回は胎生期低亜鉛食群においてカドミウムによる誘導率の増強がより顕著であった MT2 に焦点を当てエピゲノム解析を行うことにした。

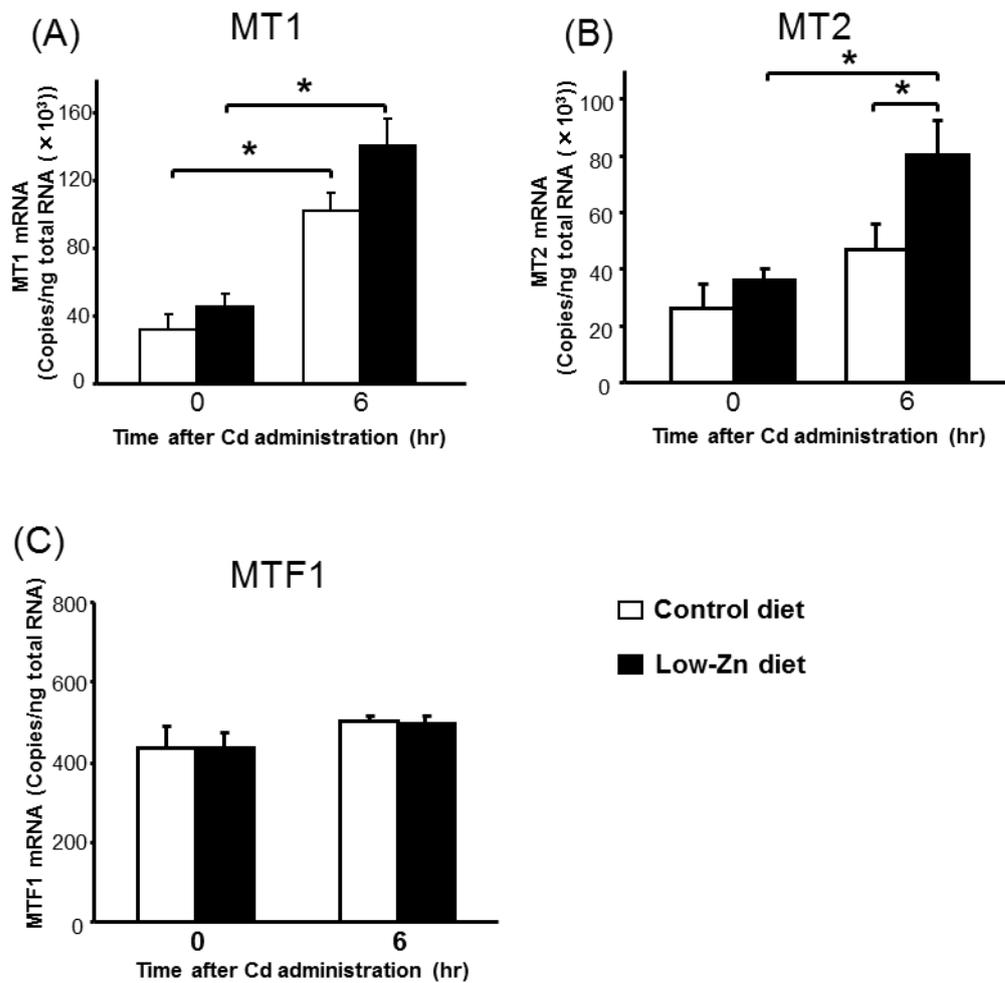


Figure 3-2. 胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウスへのカドミウム曝露による MT1、MT2、MTF1 mRNA の発現量変化

胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウスに Cd 5.0 mg/kg を単回経口投与し、投与 6 時間後の肝臓中 (A) MT1、(B) MT2、(C) MTF1 mRNA 発現量を測定した。有意差検定は two-way ANOVA 実行後、Bonferroni's test で行った (Control diet-0hr: n=5、Control diet-6hr: n=6、Low-Zn diet-0hr: n=9、Low-Zn diet-6hr: n=11、mean ± SEM、*P<0.05)。

3.3. 胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウス肝臓中 MT2 プロモーターの DNA メチル化変化

上記 3.2.で示した結果より、胎生期低亜鉛環境で育ったマウスへのカドミウム曝露による MT2 遺伝子の発現上昇は、肝臓中亜鉛及びカドミウム蓄積量の違いによるものではなく、遺伝子転写調節機構自体の異常によるものと考えられた。そこで、仔マウスの MT2 遺伝子におけるエピゲノムに変化が生じていることを想定し、最初に MT2 遺伝子プロモーターの DNA メチル化解析を行った (Figure 3-3)。

胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウス肝臓における MT2 遺伝子プロモーターの DNA メチル化変化をバイサルファイトシーケンス法で解析したところ、MTF1 が結合する MRE を含む領域においては、胎生期低亜鉛食群ならびに对照食群ともにメチル化されている CpG はほとんど観察されなかった。しかし、上流 -800bp 近傍の 3 か所の CpG でメチル化が検出できた。特に、-821bp の CpG のメチル化が胎生期低亜鉛食群 (12.1%) で、对照食群 (2.5%) に比べて増加していた (Figure 3-3A、赤矢印)。このバイサルファイトシーケンス法による解析でメチル化変化が認められた-821bp の CpG は、Methylation sensitive 制限酵素 *Aci* I の制限酵素サイトに含まれているため、*Aci* I を用いた定量 PCR 法での検証解析を行ったところ、胎生期低亜鉛食群と对照食群との間で統計学的有

意差が確認でき、Figure 3-3A を支持する結果となった (Figure 3-3B)。

以上の結果から、胎生期低亜鉛環境を経験したマウスでは MT2 プロモーターの-821bp の CpG メチル化が上昇することが示唆された。

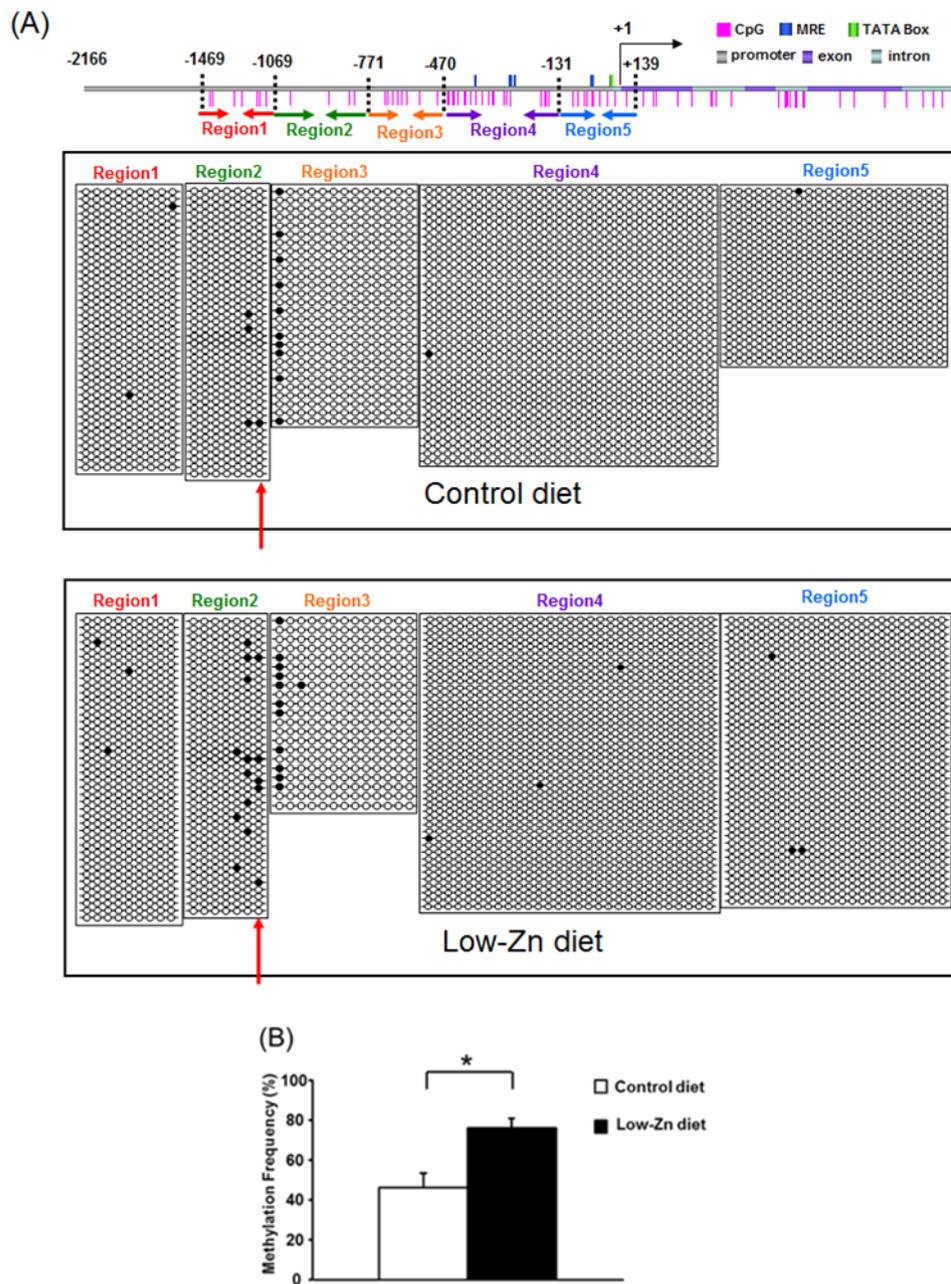


Figure 3-3. 胎生期低亜鉛環境による 5 週齢雄マウス肝臓の MT2 プロモーターの DNA メチル化への影響

胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウスの DNA メチル化を解析した。(A) Bisulfite sequencing 法を用いた解析 (○非メチル化 CpG、●メチル化 CpG)。(B) -821bp の CpG を含む領域に対するメチル化感受性制限酵素 *Aci* I を用いた定量 PCR による解析。有意差検定は Student's t-test で行った (Control diet: n=5、Low-Zn diet: n=9、mean ± SEM、*P<0.05)。

3.4. マウス肝がん細胞株 Hepa1c1c7 を用いた MT2 プロモーターの機能解析

これまでに、マウス MT2 プロモーターが遺伝子転写活性化に及ぼす機能的解析のデータはほとんど無いことから、マウス肝がん細胞株 Hepa1c1c7 を用いてレポーター遺伝子アッセイによる MT2 プロモーターの機能解析を行った (Figure 3-4)。

Hepa1c1c7 において、カドミウム曝露による MT2 遺伝子発現の誘導を調べたところ、Cd 5.0 μ M 曝露後 3 時間以降で MT2 mRNA の有意な発現増加が認められた (Figure 3-4A)。次に MT2 遺伝子転写開始点上流-2166bp を pGL4 レポータープラスミドに組み込んだコンストラクトを基本構造として、MT2 プロモーターの 4 つの MRE 配列を 1 つずつ除いた 6 種のデリーションコンストラクトを作成 (Figure 3-4B) してトランスフェクションを行い、カドミウム曝露後のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、TATA Box 配列近傍の MRE 配列以外の -397~ -65bp の領域にある 3 つの MRE が MT2 遺伝子転写誘導活性化に最も関与することが示された (Figure 3-4C)。

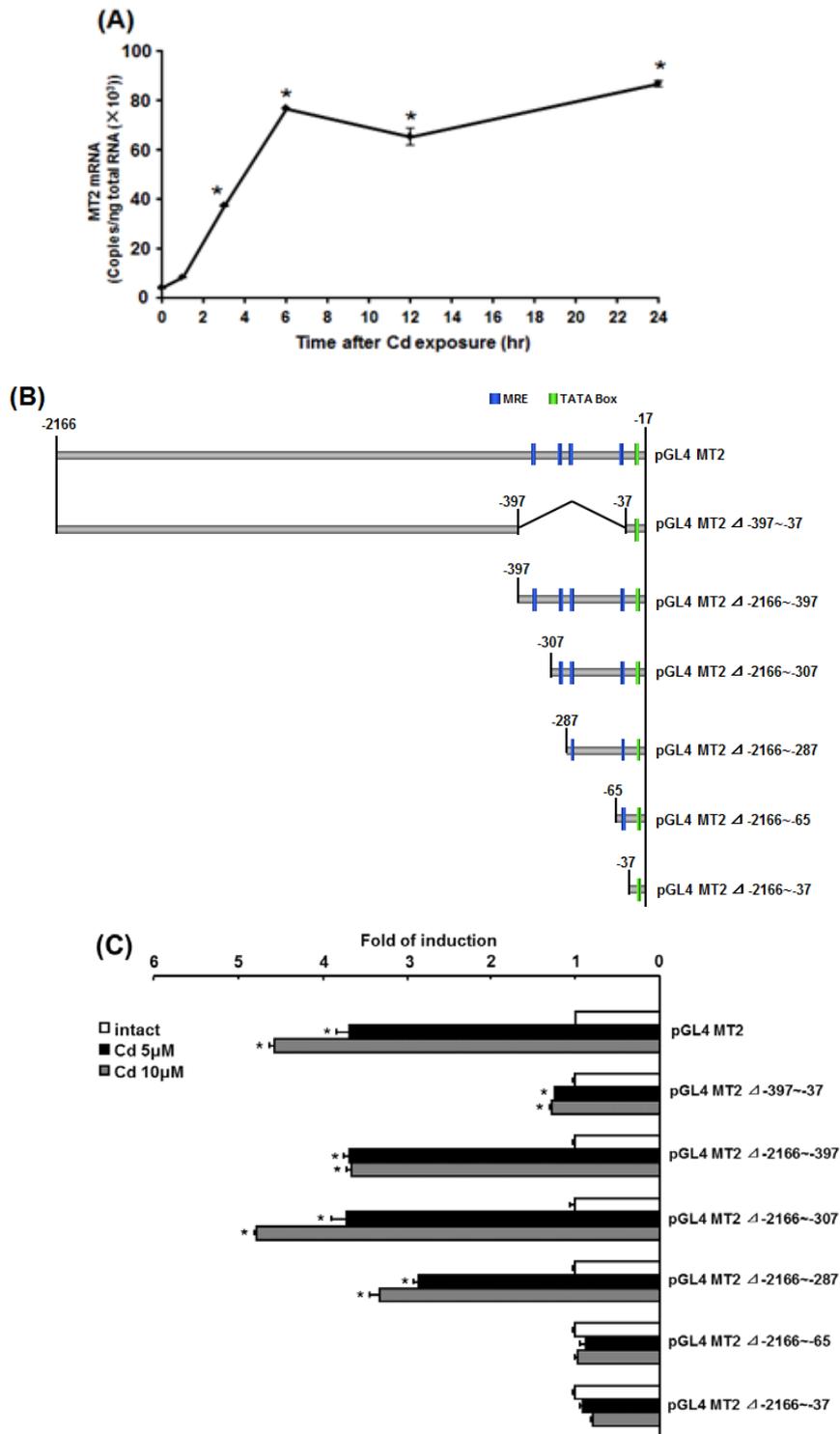


Figure 3-4. Hepa1c1c7 を用いた MT2 プロモーターの機能解析

(A) Hepa1c1c7 に Cd 5.0 μ M を曝露し 0、3、6、12、24 時間後の MT2 mRNA 発現量を測定した。有意差検定は one-way ANOVA 実行後、Bonferroni's test を行った (n=3、mean \pm SE、* $P < 0.05$ vs 0 hr)。(B) MT2 プロモーターのデリレーションコンストラクト。(C) (B) のコンストラクトを用いて Cd 5.0、10.0 μ M 曝露 24 時間後の転写活性を測定した。有意差検定は各コンストラクトについて one-way ANOVA 実行後、Bonferroni's test を行った (n=3、mean \pm SEM、* $P < 0.05$ vs intact)。

3.5. 胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウス肝臓における MT2 プロモーターのヒストン修飾変化

上記 3.2. で示した結果から、胎生期低亜鉛環境によって MT2 プロモーターの -821bp の CpG のメチル化が上昇することが示された。次に胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウスの肝臓中 MT2 プロモーターの MRE 配列を含む領域を中心に、カドミウム曝露前ならびにカドミウム曝露 6 時間後のヒストン修飾を ChIP qPCR 法により解析した (Figure 3-5)。

(1) ヒストン H3 アセチル化 (AcH3) のレベルについて： カドミウム曝露前において Region 2 の胎生期低亜鉛群で統計学的に有意に高く、Region 1 においても同様に、高アセチル化傾向が認められた。カドミウム曝露後においては、胎生期低亜鉛食群の方が対照食群に比べて、ヒストン H3 アセチル化レベルは全ての領域で有意に高かった (Figure 3-5A)。

(2) ヒストン H4 アセチル化 (AcH4) レベルについて： カドミウム曝露前において Region 1 の胎生期低亜鉛群で有意に高く、Region 2 においても同様の傾向が認められた。カドミウム曝露後においては、AcH3 と同様にすべての領域で有意な増加が認められた (Figure 3-5B)。

(3) ヒストン H3 リジン 9 アセチル化 (AcH3K9) レベルについて： カドミウム曝露前の胎生期低亜鉛食群で Region 1 でのみ増加傾向を示した。カドミ

ウム曝露後の胎生期低亜鉛食群では Region 1 と Region 2 で有意な増加が認められた (Figure 3-5C)。

(4) ヒストン H3 リジン 14 アセチル化 (AcH3K14) レベルについて： カドミウム曝露前の胎生期低亜鉛食群において Region 2 で有意な増加がみられ、Region 1 においても同様の増加傾向が認められた。カドミウム曝露後の胎生期低亜鉛食群ではすべての Region で有意な増加が認められた。また、Region 1 と Region 3 の胎生期低亜鉛食群において、カドミウム曝露前に比べてカドミウム曝露後の有意な増加がみられた (Figure 3-5D)。

(5) ヒストン H3 リジン 4 トリメチル化 (H3K4me3) レベルについて： カドミウム曝露前の胎生期低亜鉛食群において、Region 1 と Region 2 で増加傾向が認められた。カドミウム曝露後の胎生期低亜鉛食群において、Region 2 で有意な増加が認められた。そして、Region 2 の胎生期低亜鉛食群において、カドミウム曝露前に比べカドミウム曝露後の有意な増加が認められた (Figure 3-5E)。

上記 (1) から (5) の結果から、今回解析したヒストン修飾変化パターンから、胎生期低亜鉛環境によって MT2 プロモーターのクロマチン構造は、いわゆるヒストン修飾仮説から考察すると、遺伝子転写活性化状態で見られるオープンクロマチン構造に近いことが示唆された。

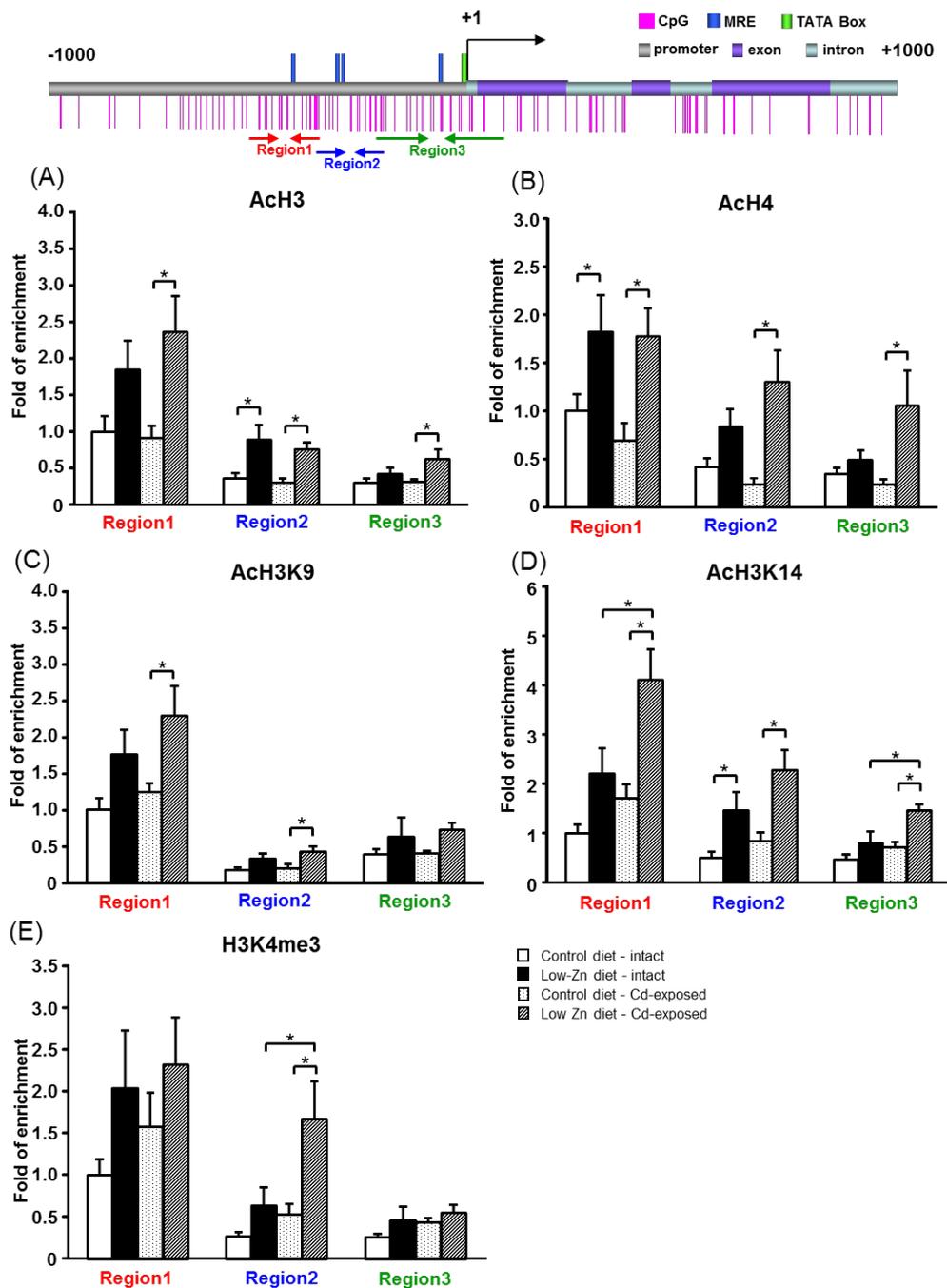


Figure 3-5. 胎生期低亜鉛環境による 5 週齢雄マウス肝臓中 MT2 プロモーターのヒストン修飾の変化

胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウスに Cd 5.0 mg/kg を単回経口投与し、投与 6 時間後の肝臓中 MT2 プロモーターのヒストン修飾を解析した。(A) ヒストン H3 アセチル化、(B) ヒストン H4 アセチル化、(C) ヒストン H3 リジン 9 アセチル化、(D) ヒストン H3 リジン 14 アセチル化、(E) ヒストン H3 リジン 4 トリメチル化を示す。有意差検定は各 Region について two-way ANOVA 実行後、Bonferroni's test で行った (n=8、mean ± SEM、*P<0.05)。

3.6. 胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウス肝臓における MT2 プロモーターの転写因子結合量変化

上記 3.5. で示した結果より、今回解析した MT2 プロモーターの MRE を含む領域においては、胎生期低亜鉛環境により遺伝子転写活性化状態を示す比較的オープンクロマチン構造になっていることが示唆された。これまでに *in vivo* でカドミウム曝露時の MT2 プロモーターへの MTF1 の結合量変化を検討した報告はない。そこで同領域における転写因子 MTF1 の結合量を ChIP qPCR 法で解析した (Figure 3-6)。

胎生期低亜鉛食群、対照食群ともに今回の検討対象の三つの Region において、カドミウム曝露 1 時間後で MTF1 の MT2 プロモーターへの結合量が増加し、6 時間後では曝露前のレベルに戻ることが示された (Figure 3-6)。カドミウム曝露後 6 時間において、Region 2 と Region 3 の胎生期低亜鉛食群での MT2 プロモーターへの MTF1 結合量が、対照食群に比べて有意に増加していた (Figure 3-6B、C)。カドミウム曝露後 1 時間では Region 2 で、胎生期低亜鉛食群の MTF1 結合量が対照食群に比べて増加傾向が認められた (Figure 3-6B)。一方、Region 1 ではカドミウム曝露後のどの時点においても、MTF1 結合量は両群間で有意な差は認められなかった (Figure 3-6A)。これらのことから、胎生期低亜鉛食群ではカドミウム曝露後の MT2 プロモーターへの MTF1 の結合時間

が長くなり、この変化が MT2 遺伝子発現量を増加させていると考えられる。

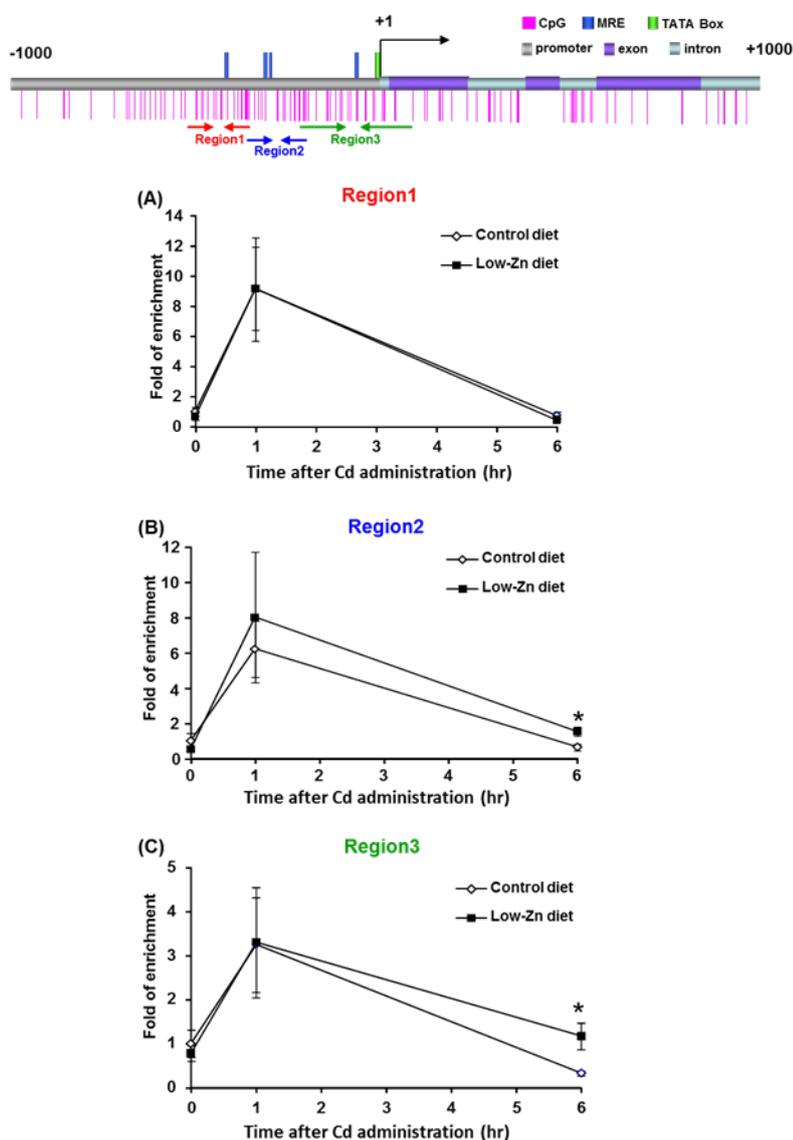


Figure 3-6. 胎生期低亜鉛環境による 5 週齢雄マウス肝臓中 MT2 プロモーターの MTF1 結合量の変化

胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウスに Cd 5.0 mg/kg を単回経口投与し、投与後 0、1、6 時間の肝臓中 MT2 プロモーターの転写因子結合量を解析した。(A) Region 1、(B) Region 2、(C) Region 3 を示す。有意差検定は各測定時間において Student's t-test で行った (n=6、mean ± SEM、*P<0.05)。

3.7. 胎生期低亜鉛環境で育った5週齢雄マウス肝臓中のMTF1タンパク質レベル

胎生期低亜鉛環境で育った5週齢雄マウス肝臓中のMTF1タンパク質の量を、核分画と細胞質分画を用いてウェスタンブロットで検討した。両分画において胎生期低亜鉛環境による変化は認められなかった (Figure 3-7)。この結果より、Figure 3-5 で確認されたカドミウム曝露後の胎生期低亜鉛環境食群におけるMT2プロモーターへのMTF1結合量および結合時間の増加は、肝臓中MTF1タンパクの発現量の違いによるものではないことが示唆された。

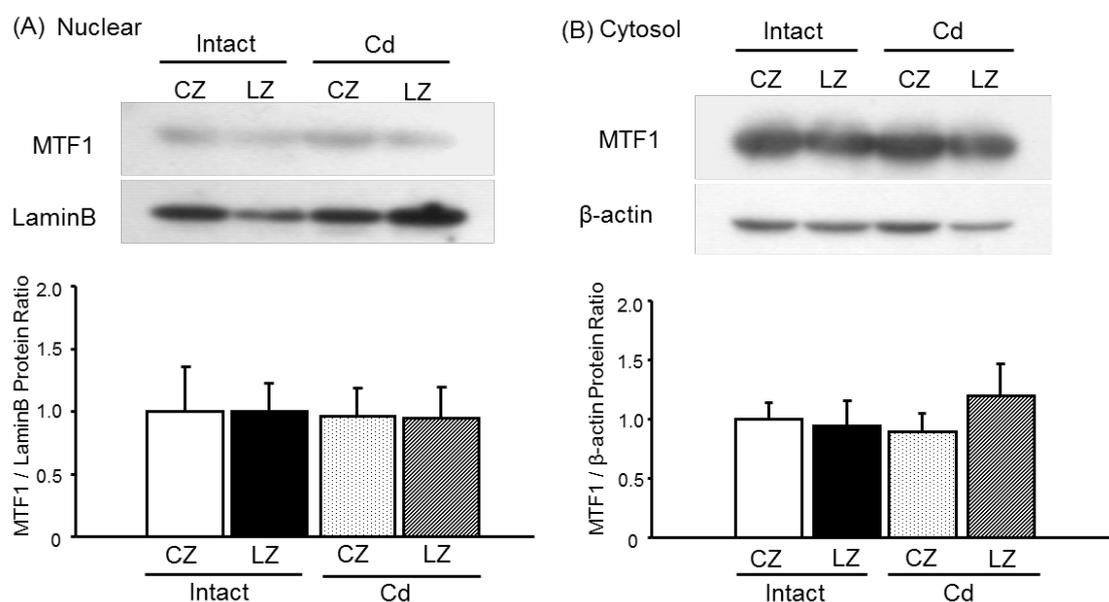


Figure 3-7. 胎生期低亜鉛環境による5週齢雄マウス肝臓中MTF1タンパク発現量変化

胎生期低亜鉛環境で育った5週齢雄マウスにCd 5.0 mg/kgを単回経口投与し、投与6時間後の肝臓中MTF1タンパク発現量を解析した。(A)核分画、(B)細胞質分画を示す。バンドの定量はデンストメーターで行った (CZ; control diet, LZ; low-zinc diet, n=5, mean ± SEM)。

3.8. 胎生期低亜鉛環境で育った生後1日齢雄マウス肝臓中MT1、MT2、MTF1 遺伝子発現量およびMT2プロモーターにおけるエピゲノム修飾変化

5週齢の雄マウスで観察された胎生期低亜鉛環境によるエピゲノム変化の時期を特定することを目的として、胎生期低亜鉛環境で育った1日齢の雄マウスの肝臓を採取し、mRNA発現レベルとヒストン修飾解析を行った。

MT1、MT2、MTF1 mRNAの発現量は、胎生期低亜鉛食群と対照食群との間で有意な変化はなかった (Figure 3-8)。5週齢でDNAメチル化に変化があったMT2プロモーター -821bpのCpGのメチル化も両群で有意な差は認められなかった (Figure 3-9)。

次にMT2プロモーターのヒストン修飾変化を検討したところ、AcH3レベルは胎生期低亜鉛食群のRegion 1とRegion 2において有意な上昇が認められ、Region 3では有意な減少が認められた (Figure 3-10A)。AcH4とAcH3K9レベルは胎生期低亜鉛群のRegion 1でのみ増加傾向が認められた (Figure 3-10B、C)。H3K4me3レベルは胎生期低亜鉛食群においてRegion 2とRegion 3で増加傾向が認められた (Figure 3-10D)。

以上から、1日齢でDNAメチル化は胎生期低亜鉛群で変化は認められなかったが、ヒストンH3アセチル化のレベルが1日齢の時点から胎生期低亜鉛食群で亢進していることが示唆された。

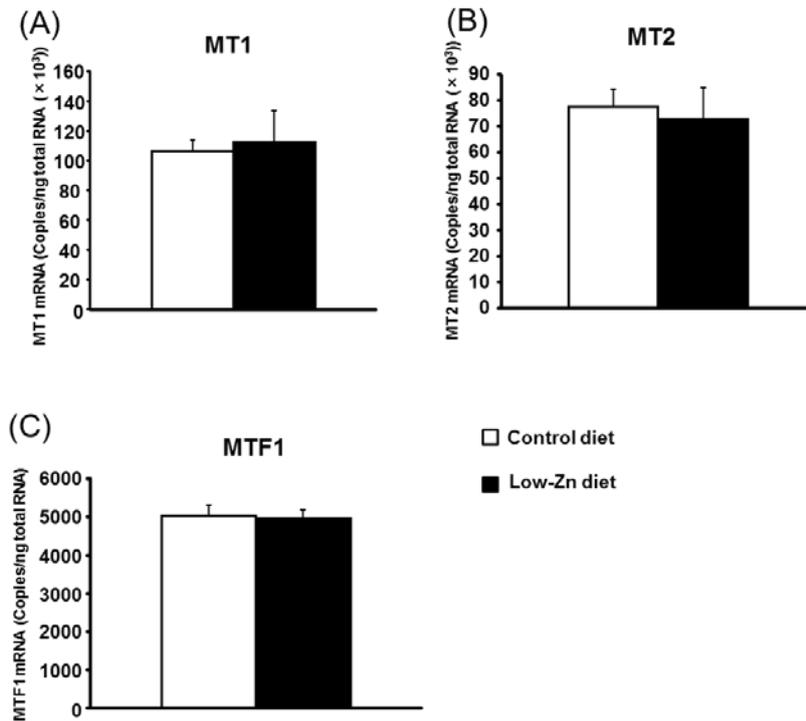


Figure 3-8. 胎生期低亜鉛環境による 1 日齢雄マウス肝臓中 MT1、MT2、MTF1 mRNA 発現変化

胎生期低亜鉛環境で育った 1 日齢雄マウスの (A) MT1、(B) MT2、(C) MTF1 mRNA 発現量を解析した (n=6、mean ± SEM)。

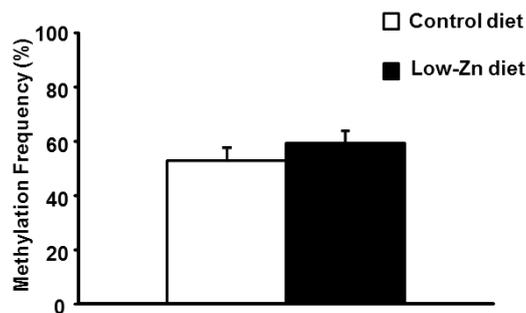


Figure 3-9. 胎生期低亜鉛環境による 1 日齢雄マウス肝臓中 MT2 プロモーター -821bp の CpG メチル化の変化

胎生期低亜鉛環境で育った 1 日齢雄マウスの肝臓中 MT2 プロモーターの-821bp の CpG を含む領域に対するメチル化感受性制限酵素 *Aci* I を用いた定量 PCR による解析 (n=6、mean ± SEM)。

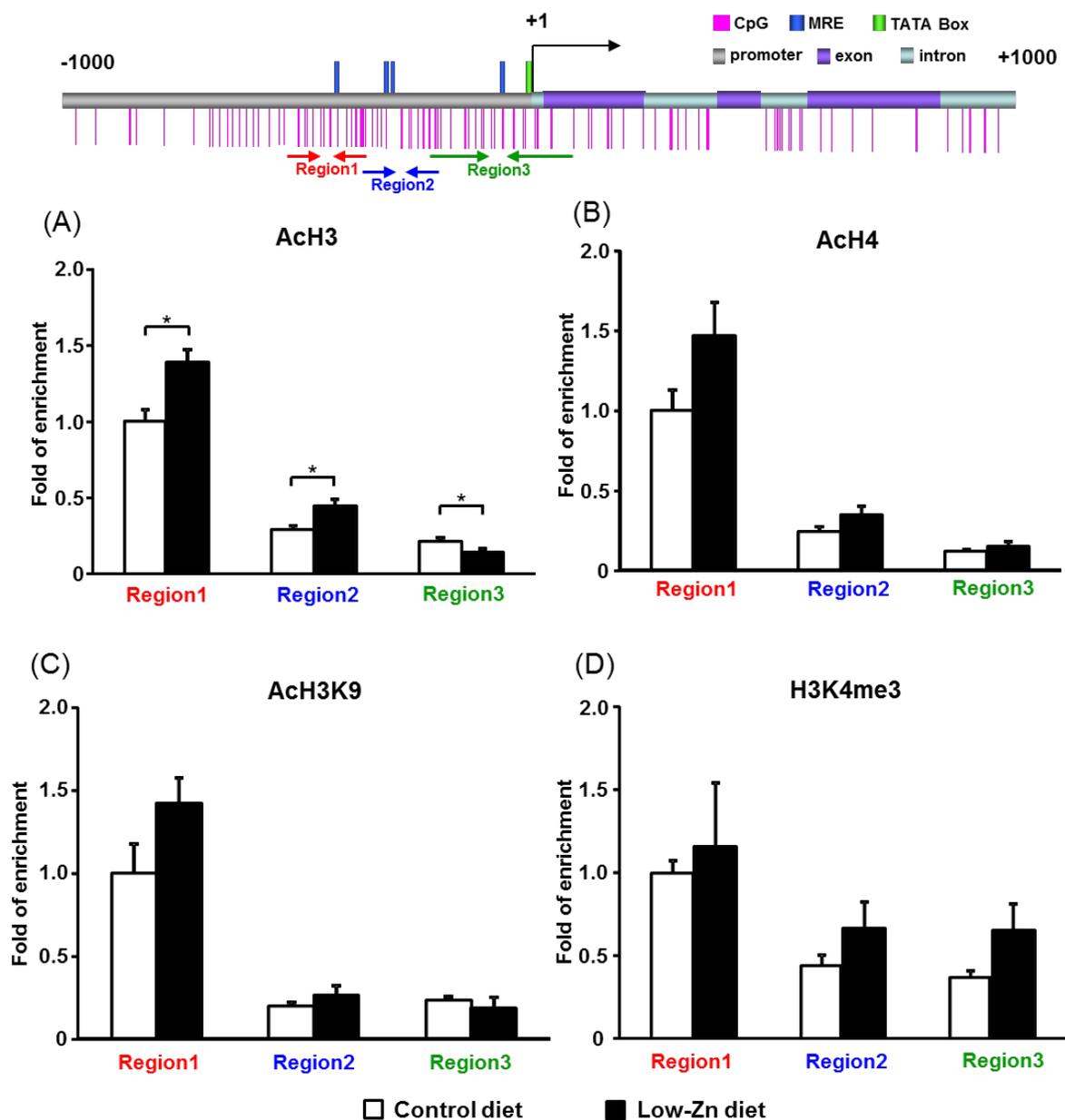


Figure 3-10. 胎生期低亜鉛環境による1日齢雄マウス肝臓中MT2プロモーターにおけるヒストン修飾変化

胎生期低亜鉛環境で育った1日齢雄マウスの肝臓中MT2プロモーターのヒストン修飾を検討した。(A) ヒストンH3アセチル化、(B) ヒストンH4アセチル化、(C) ヒストンH3リジン9アセチル化、(D) ヒストンH3リジン4トリメチル化を示す。有意差検定は各Regionについて Student's t-test で行った (n=6、mean ± SEM、*P<0.05)。

3.9. 成獣雄マウスの低亜鉛食負荷による MT1、MT2、MTF1 遺伝子発現および MT2 プロモーターにおけるエピゲノム変化

低亜鉛環境によるエピゲノム変化が胎生期特有の現象であるかどうかを検証するために、成獣雄マウスに低亜鉛食を 12 日間摂取させ、低亜鉛環境が MT2 遺伝子のエピゲノムに及ぼす影響を検討した。

まず、成獣雄マウスに Zn 5 ppm の低亜鉛食を 12 日間自由摂取させた。マウスから肝臓を摘出し、MT1、MT2、MTF1 mRNA 発現量と、MT2 プロモーター -821bp の DNA メチル化を測定した。

MT1、MT2、MTF1 mRNA 発現量について、低亜鉛食負荷による変化は認められなかった (Figure 3-11)。また、MT2 プロモーター -821bp の CpG メチル化についても低亜鉛食による変化は認められなかった (Figure 3-12)。一方、MT2 プロモーターのヒストン修飾については、AcH3 と AcH4 レベルが低亜鉛負荷によって Region 1 で増加傾向が認められたが有意な差ではなかった (Figure 3-13A、B)。その他の AcH3K9、AcH3K14、H3K4me3 レベルについては、低亜鉛負荷による変化は認められなかった (Figure 3-13C、D、E)。

以上の結果から、本研究における低亜鉛環境によるエピゲノム変化は胎生期において顕著であることが示された。

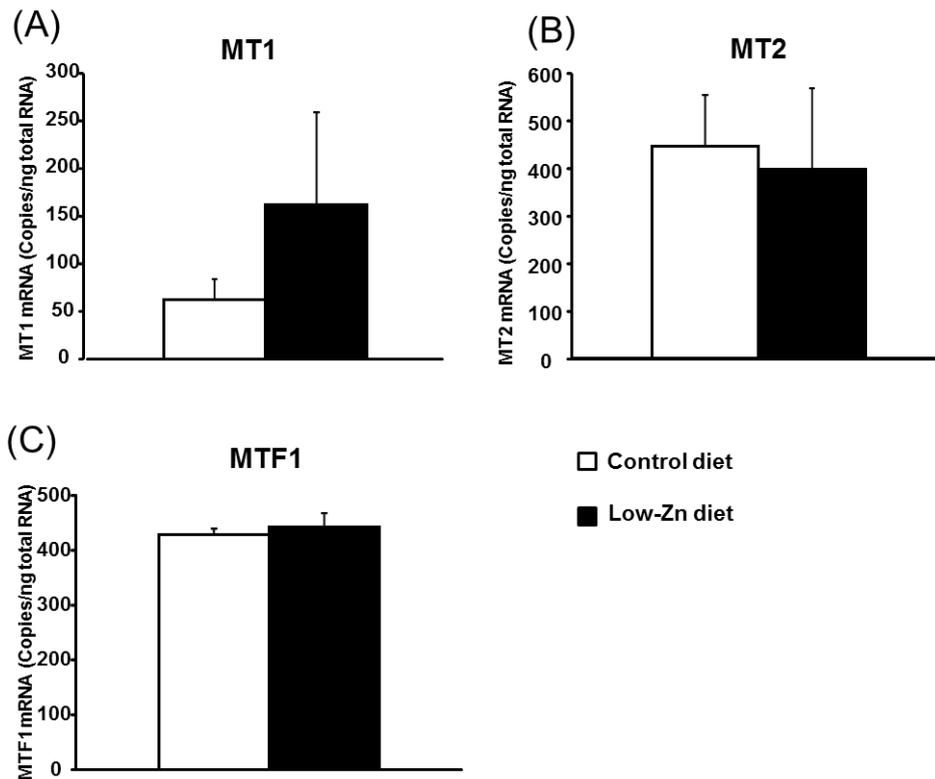


Figure 3-11. 12 日間低亜鉛食負荷による成獣雄マウス肝臓中 MT1、MT2、MTF1 mRNA 発現変化

低亜鉛食 (Zn 5 ppm) ならびに対照食 (Zn 35 ppm) を 10 週齢雄マウスに 12 日間自由摂取させた直後の (A) MT1、(B) MT2、(C) MTF1 mRNA 発現量を解析した (n=3、mean ± SEM)。

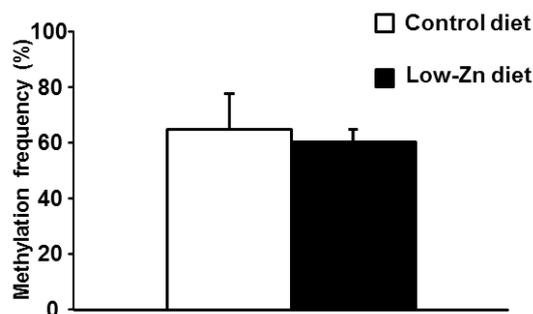


Figure 3-12. 12 日間低亜鉛食負荷による成獣雄マウス肝臓中 MT2 プロモーター -821bp の CpG メチル化の変化

低亜鉛食 (Zn 5 ppm) ならびに対照食 (Zn 35 ppm) を 10 週齢雄マウスに 12 日間自由摂取させた直後の MT2 プロモーターの-821bp の CpG を含む領域に対するメチル化感受性制限酵素 *Aci I* を用いた定量 PCR による解析 (n=3、mean ± SEM)。

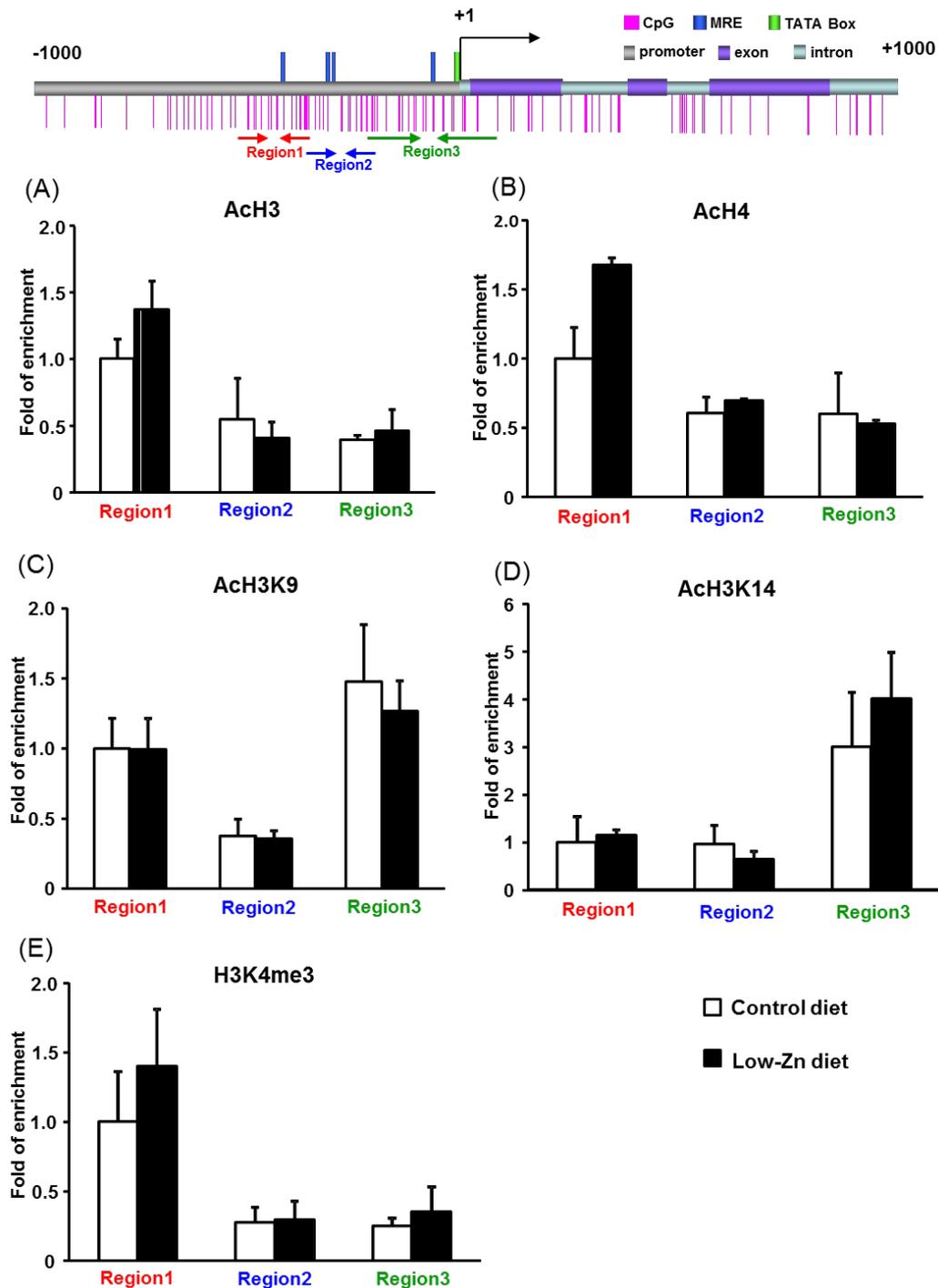


Figure 3-13. 12日間低亜鉛食負荷による成獣雄マウス肝臓中 MT2 プロモーターのヒストン修飾の変化

低亜鉛食 (Zn 5 ppm) ならびに対照食 (Zn 35 ppm) を 10 週齢雄マウスに 12 日間自由摂取させた直後の MT2 プロモーターのヒストン修飾を測定した。(A) ヒストン H3 アセチル化、(B) ヒストン H4 アセチル化、(C) ヒストン H3 リジン 9 アセチル化、(D) ヒストン H3 リジン 14 アセチル化、(E) ヒストン H3 リジン 4 トリメチル化を示す (n=3, mean ± SEM)。

3.10. 成獣雄マウスにおける低亜鉛食負荷後、通常食飼育1ヶ月後におけるカドミウム曝露時のMT1、MT2、MTF1遺伝子発現への影響

成獣雄マウスに低亜鉛負荷を12日間行った後、1ヶ月間通常食で飼育後にCd 5.0 mg/kg 単回経口投与し、6時間後のMT1、MT2、MTF1 mRNA 発現量を測定した。低亜鉛負荷によるMT1、MT2 mRNA 発現量は、カドミウム曝露に関わらず有意な差は認められなかった (Figure 3-14A、B)。MTF1 mRNA はカドミウム曝露に関わらず、低亜鉛食負荷により発現量が有意に減少した (Figure 3-14C)。

これらの結果から、低亜鉛環境を経験した成獣マウスの亜鉛レベルを回復させた状態において、過去の低亜鉛環境の影響はMT遺伝子の誘導を変化させることはないことがわかった。

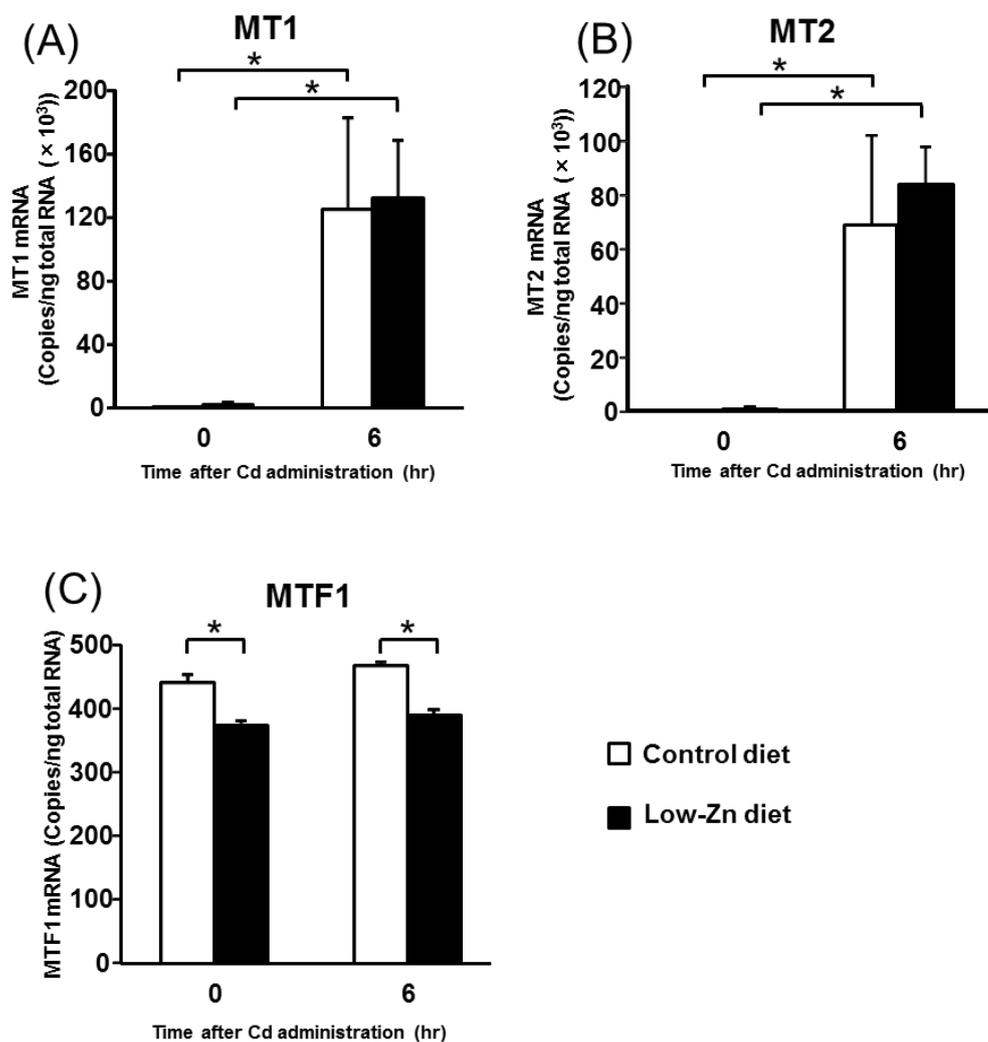


Figure 3-14. 12日間低亜鉛食負荷後に1ヶ月間通常食飼育後の成獣雄マウスにおけるカドミウム曝露によるMT1、MT2、MTF1 mRNA 発現変化

低亜鉛食 (Zn 5 ppm) ならびに対照食 (Zn 35 ppm) を10週齢雄マウスに12日間自由摂取させ、通常食で1ヶ月飼育後 Cd 5.0 mg/kg を単回経口投与し、投与6時間後の (A) MT1、(B) MT2、(C) MTF1 mRNA を測定した。有意差検定は two-way ANOVA 実行後、Bonferroni's test で行った (n=3、mean \pm SEM、*P<0.05)。

第4章 考察

4.1. 胎生期低亜鉛環境によるヒストン修飾変化はエピジェネティックメモリーとして残り成熟後のMT2 遺伝子誘導増強に関与する

必須微量元素欠乏の代表例として、亜鉛欠乏に伴う健康影響が世界的に問題となっており、発展途上国においては、6~65 ヲ月齡の子供の死亡率の約 4.4% が亜鉛欠乏に起因すると算出されている⁸。また、胎生期に低亜鉛環境におかれた実験動物では、成熟後に、高血圧⁴¹、学習記憶機能異常^{42,43}など様々な病態が観察されること、あるいは、免疫機能低下⁴⁴、DNA 損傷¹⁰²、亜鉛による MT 誘導増強⁴⁵などの生理的な変化が引き起こされることが報告されている。しかしこれらの発症メカニズムを個体レベルでエピジェネティックな視点から研究した事例はなかった。そこで、胎生期低亜鉛環境が仔へのエピゲノム変化を引き起こし、それが成長後まで維持されるという仮説を設定し、MT 遺伝子に焦点を当てて解析した。

本研究において、胎生期に低亜鉛環境で育ったマウスは、成熟後にカドミウムに曝露すると MT2 遺伝子発現誘導性が増強することが判明した。この現象は、既報での胎生期低亜鉛環境による亜鉛投与時の MT 発現量増強⁴⁵の報告を再現する結果と思われる。また、胎生期低亜鉛環境のいかんにかかわらず、この時

の肝臓中亜鉛・カドミウム蓄積量には有意な差異は認められなかったことから、前述の MT2 遺伝子発現量増強は、遺伝子発現調節機構に何らかの異常が生じたことによる可能性が示唆された。この背景にあるメカニズムとして、エピゲノム変化の可能性を考え、MT2 プロモーターの DNA メチル化とヒストン修飾の解析を行った。

その結果、MT2 プロモーターの-821bp の CpG メチル化が胎生期低亜鉛食群で上昇していることがわかった。この領域周辺には MRE が無く、レポータージーンアッセイでもこの DNA 領域の存在はカドミウムによる転写誘導性に影響を及ぼさなかったため、少なくとも重金属曝露による MT2 誘導性には関与していないと考えられる。この-821bp CpG の高メチル化変化が如何なる生理的意味を持つかは定かでないが、MT2 遺伝子の転写を制御する他のシグナルに関与する可能性を考慮して、さらなるプロモーター機能的解析を行う必要があると考えられる。

一方、胎生期低亜鉛環境で育ったマウス肝臓の MT-2 プロモーターの MRE を含む領域において、ヒストン修飾に変化が認められた。いわゆるヒストン修飾仮説から考えると、このヒストン修飾変化のパターンは、解析対象のプロモーター領域がカドミウムによる誘導に関わらず、既にオープンクロマチン構造になっていることを示している。特にヒストン H3 アセチル化は胎生期低亜鉛食

群で既に 1 日齢の時点で亢進していたことから、胎生期低亜鉛環境によるヒストン修飾変化は出生初期には成立していることがうかがえる。このエピジェネティックメモリーは成熟後まで残り、成熟後の MT2 遺伝子誘導能の増強に關与するのだろう。

これまでに、胎生期低タンパク質状態で育った成熟ラットが高血圧を發症し、肝臓の GR や PPAR α 遺伝子の DNA メチル化が低下する^{38,39}ことや、子宮胎盤循環虚血法によって胎生期低栄養状態で育った成熟ラットが 2 型糖尿病症状を示し、ランゲルハンス島において Pdx1 遺伝子の DNA メチル化が上昇し、ヒストン H3、H4 のアセチル化が低下する^{103,104}ことが報告されている。このように、胎生期低栄養状態が仔のエピゲノム変化を介して成熟した後に疾患發症に關与するという DOHaD 概念を支持する知見がある。しかし、これらの報告は特定の栄養素に注目した報告ではなかった。また、これまでに必須微量元素に注目し DOHaD の視点からエピゲノム解析は行われていない。本論文での知見は、胎生期における微量元素栄養環境がエピゲノム変化引き起こし、成熟後の生理現象に影響することを初めて明らかにしたものである。

それでは、胎生期低亜鉛環境による成熟後の MT2 遺伝子誘導の増強は個体においてどのような生物学的意義をもつのであろうか。これまでに胎生期低亜鉛環境において、MT1/2 ノックアウトマウスでは胎仔奇形發症率が野生型マウス

より有意に高くなることが報告されている¹⁰⁵。一方、MT1 過剰発現マウスではその胎仔奇形が抑制されることも報告されている¹⁰⁶。また MT1/2 ノックアウトマウスは成熟してからの低亜鉛負荷による腎臓中ゴーマン嚢肥大が野生型に比べて増悪するという研究もある¹⁰⁷。MT1/2 は亜鉛含有酵素への亜鉛供給など、細胞中亜鉛恒常性維持に重要な役目を担っていること⁶³⁻⁶⁵からも、MT1/2 は低亜鉛環境から生体を守る防御因子として重要であると考えられる。本研究で得られた結果から、胎生期低亜鉛環境で育ったマウスは胎生期に経験した低亜鉛環境をエピゲノムとして記憶し、成熟後の将来の低亜鉛環境に対して MT 誘導能を増強することで適応しているのかもしれない。この考えは、Barker 仮説において低栄養環境で生まれた子供が肥満体質になることを説明する上で用いられる儉約遺伝子仮説¹⁰⁸、すなわち、胎生期に低栄養環境を経験した成人は、少ないエネルギーを有効に利用できるように形質転換され、出生後の将来の飢餓状態に適応するだろうという仮説にも通じると思われる。

4.2. 胎生期低亜鉛食群ではカドミウム曝露後の MT2 プロモーターへの MTF1 結合時間が延長する

本研究では、胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢マウスにおいて、カドミウム曝露時の MTF1 結合時間が長くなることにより、MT2 遺伝子誘導増強を引き起

こすことが示唆された。これらの結果は、上記 4.1.で述べたように、胎生期低亜鉛食群で MT2 プロモーターは比較的オープンクロマチン状態になっているので、MTF1 が MT2 プロモーターにアクセスし易くなったためと考えられる。さらに、胎生期低亜鉛食群では MTF1 が MT2 プロモーターにより長く留まっている分、遺伝子転写がより長く行われ、累積の MT2 mRNA 量が定量 RT-PCR 測定時点で対照食群より有意に高くなったと考えられる。

MTF1 結合時間延長の他の理由として、カドミウム曝露後の MTF1 の通常の分解速度が抑制されることで、MTF1 がプロモーター上に存在し続けていることが考えられる。タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドを遺伝子誘導性の化学物質とともに投与すると、その遺伝子転写産物である mRNA レベルが数十倍になる現象を超誘導 (Superinduction) という。超誘導が認められる代表的な遺伝子として、ダイオキシン受容体の AhR を介した CYP1A1 遺伝子調節系¹⁰⁹ と、MTF1 を介した MT1 遺伝子調節系¹¹⁰ がある。この現象を引き起こすメカニズムの説明として、非常に不安定な転写抑制因子 (labile repressor) の存在が想定されている^{110,111}。この因子は遺伝子誘導後の転写因子の分解を促進することによって、一旦上昇した遺伝子誘導レベルを下げると考えられている。そのため、シクロヘキシミド存在下では、labile repressor の合成が阻害され、転写抑制が外れた状態となり、超誘導が引き起こされると考えられている^{110,111}。本

研究の 3.6.の結果では、胎生期低亜鉛食群において、なんらかの理由で labile repressor の働きが抑制されることで MTF1 の分解が阻害されている可能性がある。今回発見したヒストン修飾の変化はこの仮想のタンパク性因子の探索に有効な現象なのかもしれない。

4.3. 胎生期低亜鉛環境によるヒストン修飾変化はどのようなメカニズムで起きるのか？

本研究から、胎生期低亜鉛環境で育った仔マウスにおいて、MT2 プロモーターのヒストン H3 アセチル化が出産直後に上昇することが示された。したがってこのヒストン H3 アセチル化変化は胎生期に引き起こされると考えられる。それでは、胎生期低亜鉛環境による MT2 のヒストン H3 のアセチル化はどのようなメカニズムによって引き起こされるのであろうか。既報において、胎生期低亜鉛環境では胎仔の MT 発現は通常よりも低下している¹¹²ことが示されている。この変化は、胎仔の亜鉛レベルが低下するために、MTF1 を介した MT の転写が抑制されるために引き起こされると考えられる。しかし、このような遺伝子転写の抑制された状態が引き金となり、HAT によってヒストンアセチル化が促進、もしくは HDAC の機能が低下し相対的にヒストンアセチル化が増加するような報告はこれまでにない。本研究においては、胎生期低亜鉛環境によっ

て引き起こされる二次的な要因が HAT や HDAC の働きを攪乱していることが考えられる。今後、胎生期の肝臓を使った初代培養系の *in vitro* 試験で、HAT や HDAC 阻害剤、遺伝子導入や遺伝子ノックダウンの手法を用い、これらの詳細な分子メカニズムを解明する必要があるだろう。

一方、胎生期低亜鉛食群におけるヒストン H3 アセチル化以外のヒストン修飾変化は、出生後の通常食に切り替えた時点以降に引き起こされると考えられる。前述の通り、胎生期低亜鉛環境を経験したマウスでは、出生時にすでにヒストン H3 アセチル化亢進により MT2 プロモーターはオープンクロマチン状態になっている。そこに、通常食摂取による亜鉛シグナルが入って来ることが引き金となり、転写因子の MTF1 とともに、p300 などのヒストン修飾酵素群が MT2 プロモーターへとアクセスし易くなることで、胎生期低亜鉛食群におけるその他のヒストン修飾変化が引き起こされることが考えられる。つまり、胎生期低亜鉛食群における出生直後の仔マウスの MT2 プロモーターは、外的シグナルによるヒストン修飾変化をより受けやすい状態にある可能性がある。これらを検証するためには、MT2 プロモーターにおけるヒストン修飾パターン、MTF1、p300 などの結合量変化について、通常食に切り替えた以降に時間を追って詳細に検討する必要があるだろう。

4.4.胎生期の低亜鉛環境負荷はエピゲノム変化に対して高感受性である

低亜鉛環境によるエピゲノム変化が成熟後でも引き起こされるかを確認するために、成獣雄マウスに低亜鉛食負荷を行い MT2 のエピゲノム変化を検討した。ヒストン H3 および H4 のアセチル化は若干の増加傾向を示したものの有意な差は認められなかったことから、胎生期の方が低亜鉛環境に対するエピゲノム変化に対する感受性が高いことが明らかとなった。

DOHaD のような胎生期環境によるエピゲノム変化を介した生後の疾患発症以外に、成熟後の環境因子によるエピゲノム変化が引き起こす疾患発症の可能性が考えられている。これまでによく知られている例はがんである。大腸がんにおけるエストロゲンレセプター遺伝子の DNA メチル化の亢進¹¹³や、ピロリ菌感染による胃がんにおける、p16 などの複数のがん抑制遺伝子の DNA メチル化亢進^{114,115}などである。これらの発がん誘発はいずれも慢性炎症による DNA メチル化異常と関連が深いと考えられている^{116,117}。その他にも、長期高脂肪食負荷により 2 型糖尿病を発症させたマウスにおける PPAR γ 遺伝子プロモーターの低メチル化¹¹⁸、コカイン 1 週間反復投与後マウスにおける脳の側坐核の PPIc 遺伝子プロモーターの高メチル化ならびに fosB 遺伝子プロモーターの低メチル化¹¹⁹など、成熟後の栄養状態、化学物質曝露のような様々な環境要因によりエピゲノム変化が起こることが示唆されている。本研究において、成獣マウス

に対する低亜鉛食負荷を胎児期実験と同じ期間で行ったが MT2 遺伝子のエピゲノム変化は検出されなかった。もっとも、さらに長期間慢性的に低亜鉛食負荷を与えた場合は、エピゲノム変化が誘発されるかもしれない。

4.5. 結論

本研究から、胎生期に低亜鉛環境で育ち、出産後に通常食で育った仔が成熟後にカドミウムに曝露すると MT2 の誘導が増強することが明らかとなり、このメカニズムとして、MT2 プロモーターでのエピゲノム変化、特にヒストンのアセチル化が亢進し、それがエピジェネティックメモリーとして成熟後まで残ることによる可能性が明らかとなった (Figure 4)。これまでに低タンパク質食などの栄養環境が胎生期においてエピゲノム変化を引き起こすことが示されているが、本研究において、胎生期における微量元素環境も仔へのエピゲノム変化を引き起こすことが初めて明らかとなった。本研究で得られた知見は、DOHaD 仮説を胎生期微量元素の作用という観点から支持するものであり、疾患の予防と健康の増進にとって、胎児期環境の重要性を示す証拠のひとつとなると考える。

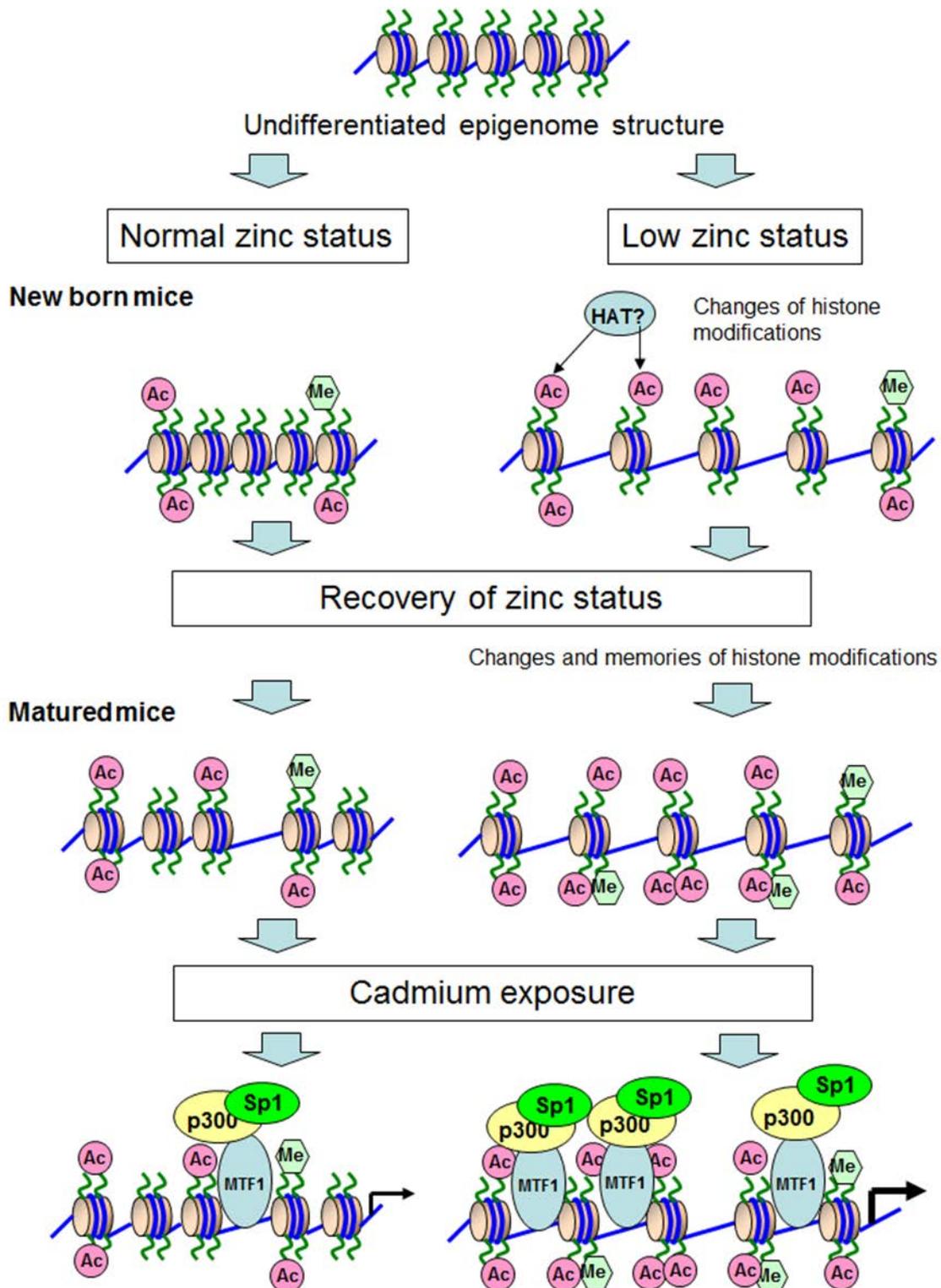


Figure 4. 本研究で得られた胎生期低亜鉛環境によるMT2遺伝子のエピゲノム変化のまとめ

4.6. 今後の課題

本研究において、胎生期低亜鉛環境による仔における MT2 遺伝子のエピゲノム変化を捉えることができた。しかし、以下に示すように、今後検討していかなければならない課題がある。

第一に、本実験系における母マウスおよび仔マウスにおける亜鉛の体内動態についての検討である。Beach らのグループが行った胎生期低亜鉛実験系 (Swiss Webster マウスを妊娠 7 日目から分娩時まで Zn 5ppm の低亜鉛食で飼育) では、母マウスの血漿中亜鉛濃度の減少と摂餌量減少、生後 1 日目で仔マウス肝臓中亜鉛蓄積量の低下が引き起こされている^{44,45}。本実験系はこれとほぼ同じ条件ではあるが、母マウスの摂餌量減少は認められなかった。これはマウスの系統が C57BL/6J であることや、低亜鉛食の組成が異なっていることが原因と考えられる。先行報告の胎生期、新生児期低亜鉛食実験では仔における臓器中亜鉛蓄積量は必ずしも低下するという報告ばかりではなく、臓器によっては変化が認められない場合^{120,121} やむしろ亜鉛蓄積量が増加する¹²² という報告もある。このことから、異なる実験条件ごとの母仔における亜鉛体内動態の評価は重要である。また、胎生期低亜鉛環境によるエピゲノム変化を引き起こすメカニズムを考える上でも、胎生期における母仔それぞれにおける亜鉛の動態を把握しておくことは有用であると考えられる。

第二に、胎生期低亜鉛環境によるエピゲノム変化と疾患との関連性についての解明である。本研究では、胎生期低亜鉛環境が引き起こす仔でのエピゲノム変化を介した MT2 の誘導能の増強が認められた。MT1/2 と疾患の関わりについては、MT1/2 ノックアウトマウスで DMBA による皮膚がんが増悪化するという発がん⁷¹との関連性や、高脂肪食負荷により MT1/2 ノックアウトマウスにおいて白色脂肪量が増加し肥満になるという報告⁷³がある。このように、MT1/2 は疾患の増悪化に対して防御的に働くことから、本研究における胎生期低亜鉛環境によって MT2 の誘導能が増強した個体は、成熟後の外的因子によって引き起こされる疾患に関して耐性を持っているのかもしれない。今後は、発がん、生活習慣病、学習記憶行動への影響などの、病態の評価系を用いた胎生期低亜鉛環境と疾患の関連性を解明し、これらの病態に関与する遺伝子群についても、本研究における MT2 で認められたようなエピゲノム変化が引き起こされるのかを解明する必要がある。

謝辞

本研究を遂行するにあたり貴重な研究の機会・場を与えて下さり、多大なご指導とご鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター健康環境医工学部門、遠山千春教授に謹んで感謝の意を申し上げます。また、実験遂行にあたり終始的確なご指摘、ご助言を賜りました同部門の大迫誠一郎准教授に感謝いたします。

ICP-MS を用いた臓器中金属測定に関して、ご指導を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科環境健康システム学分野、吉永淳准教授に感謝いたします。

Bisulfite sequencing 法の当研究室におけるハイスループット化に際してご指導賜りました東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室、橋本真一特任准教授に感謝いたします。

最後に、本研究の遂行に際し、的確なご助言をして下さった東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター健康環境医工学部門の皆様に感謝いたします。

参考文献

- 1 Tipton, I. H. & Cook, M. J. Trace elements in human tissue. II. Adult subjects from the United States. *Health Phys* **9**, 103-145 (1963).
- 2 Yanagisawa, H. & Nodera, M. Zinc Physiology and Clinical Practice. *Biomedical Research on Trace Elements* **18**, 3-9 (2007).
- 3 Vallee, B. L. & Falchuk, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* **73**, 79-118 (1993).
- 4 Hunt, J. R. Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets. *Am J Clin Nutr* **78**, 633S-639 (2003).
- 5 Wastney, M. E., Ahmed, S. & Henkin, R. I. Changes in regulation of human zinc metabolism with age. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **263**, R1162-1168 (1992).
- 6 Menzano, E. & Carlen, P. L. Zinc Deficiency and Corticosteroids in the Pathogenesis of Alcoholic Brain Dysfunction—A Review. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **18**, 895-901, (1994).
- 7 Jeejeebhoy, K. Zinc: An Essential Trace Element for Parenteral Nutrition. *Gastroenterology* **137**, S7-S12, (2009).
- 8 Fischer Walker, C. L., Ezzati, M. & Black, R. E. Global and regional child mortality and burden of disease attributable to zinc deficiency. *Eur J Clin Nutr* **63**, 591-597 (2009).
- 9 Black, R. E., Allen, L. H., Bhutta, Z. A., Caulfield, L. E., de Onis, M., Ezzati, M., Mathers, C., Rivera, J., Maternal and Child Undernutrition Study Group. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *The Lancet* **371**, 243-260 (2008).
- 10 Sachdev, H. S., Fall, C. H., Osmond, C., Lakshmy, R., Dey Biswas, S. K., Leary, S. D., Reddy, K. S., Baker, D. J., & Bhargava, S. K. Anthropometric indicators of body composition in young adults: relation to size at birth and serial measurements of body mass index in childhood in the New Delhi birth cohort. *Am J Clin Nutr* **82**, 456-466 (2005).
- 11 Bhargava, S. K., Sachdev, H. S., Fall, C. H., Osmond, C., Lakshmy, R., Barker, D. J., Biswas, S. K., Ramji, S., Prabhakaran, D., & Reddy, K. S. Relation of Serial Changes in Childhood Body-Mass Index to Impaired Glucose Tolerance in Young Adulthood. *New England Journal of Medicine* **350**, 865-875, (2004).
- 12 Crowther, N. J., Cameron, N., Trusler, J. & Gray, I. P. Association between poor glucose tolerance and rapid post natal weight gain in seven-year-old children. *Diabetologia* **41**, 1163-1167, (1998).

- 13 Crowther, N. J., Trusler, J., Cameron, N., Toman, M. & Gray, I. P. Relation between weight gain and beta-cell secretory activity and non-esterified fatty acid production in 7-year-old African children: results from the Birth to Ten study. *Diabetologia* **43**, 978-985, (2000).
- 14 Popkin, B. M. An overview on the nutrition transition and its health implications: the Bellagio meeting. *Public Health Nutrition* **5**, 93-103, (2002).
- 15 Doak, C. M., Adair, L. S., Bentley, M., Monteiro, C. & Popkin, B. M. The dual burden household and the nutrition transition paradox. *Int J Obes Relat Metab Disord* **29**, 129-136 (2004).
- 16 Uauy, R., Kain, J., Mericq, V., Rojas, J. & Corvalan, C. Nutrition, child growth, and chronic disease prevention. *Annals of Medicine* **40**, 11 - 20 (2008).
- 17 Lukito, W. & Wahlqvist, M. L. Weight management in transitional economies: the "double burden of disease" dilemma. *Asia Pac J Clin Nutr* **15 Suppl**, 21-29 (2006).
- 18 Barker, D. J., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D. & Wadsworth, M. E. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *Bmj* **298**, 564-567 (1989).
- 19 Barker, D. J. P., Osmond, C., Winter, P. D., Margetts, B. & Simmonds, S. J. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* **334**, 577-580 (1989).
- 20 Hales, C. N, Barker, D. J., Clark, P. M., Cox, L. J., Fall, C., Osmond, C., & Winter, P. D. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *Bmj* **303**, 1019-1022 (1991).
- 21 Forsén, T., Eriksson, J. G., Tuomilehto, J., Osmond, C. & Barker, D. J. P. Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart disease: longitudinal study. *Bmj* **319**, 1403-1407 (1999).
- 22 Eriksson, J. G., Forsén, T., Tuomilehto, J., Osmond, C. & Barker, D. J. P. Early adiposity rebound in childhood and risk of Type 2 diabetes in adult life. *Diabetologia* **46**, 190-194 (2003).
- 23 Gillman, M. W., Barker, D., Bier, D., Cagampang, F., Challis, J., Fall, C., Godfrey, K., Gluckman, P., Hanson, M., Kuh, D., Nathanielsz, P., Nestel, P., & Thornburg, K. L. Meeting Report on the 3rd International Congress on Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). *Pediatric Research* **61**, 625-629 (2007).
- 24 Waterland, R. A. & Michels, K. B. Epigenetic Epidemiology of the Developmental Origins Hypothesis. *Annual Review of Nutrition* **27**, 363-388 (2007).
- 25 Dennison, E. M., Syddall, H. E., Sayer, A. A., Gilbody, H. J. & Cooper, C. Birth Weight and Weight at 1 Year Are Independent Determinants of Bone Mass in the Seventh Decade: The Hertfordshire Cohort Study. *Pediatric Research* **57**, 582-586 (2005).

- 26 Kajantie, E., Phillips, D. I., Osmond, C., Barker, D. J., Forsen, T. & Eriksson, J. G. Spontaneous hypothyroidism in adult women is predicted by small body size at birth and during childhood. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 4953-4956 (2006).
- 27 Wahlbeck, K., Forsen, T., Osmond, C., Barker, D. J. P. & Eriksson, J. G. Association of Schizophrenia With Low Maternal Body Mass Index, Small Size at Birth, and Thinness During Childhood. *Arch Gen Psychiatry* **58**, 48-52 (2001).
- 28 Raikkonen, K., Pesonen, A. K., Kajantie, E., Heinonen, K., Forsen, T., Phillip, D. I., Osmond, C., Barker, D. J., & Eriksson, J. G. Length of gestation and depressive symptoms at age 60 years. *The British Journal of Psychiatry* **190**, 469-474 (2007).
- 29 Thompson, C., Syddall, H., Rodin, I., Osmond, C. & Barker, D. J. P. Birth weight and the risk of depressive disorder in late life. *The British Journal of Psychiatry* **179**, 450-455 (2001).
- 30 Gale, C. R. & Martyn, C. N. Birth weight and later risk of depression in a national birth cohort. *The British Journal of Psychiatry* **184**, 28-33 (2004).
- 31 Cheung, Y. B., Khoo, K. S., Karlberg, J. & Machin, D. Association between psychological symptoms in adults and growth in early life: longitudinal follow up study. *Bmj* **325**, 749 (2002).
- 32 Okasha, M., Gunnell, D., Holly, J. & Davey Smith, G. Childhood growth and adult cancer. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **16**, 225-241 (2002).
- 33 Okasha, M., McCarron, P., Gunnell, D. & Davey Smith, G. Exposures in Childhood, Adolescence and Early Adulthood and Breast Cancer Risk: a Systematic Review of the Literature. *Breast Cancer Research and Treatment* **78**, 223-276 (2003).
- 34 Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M. & Meaney, M. J. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* **7**, 847-854 (2004).
- 35 Ho, S.-M., Tang, W.-Y., Belmonte de Frausto, J. & Prins, G. S. Developmental Exposure to Estradiol and Bisphenol A Increases Susceptibility to Prostate Carcinogenesis and Epigenetically Regulates Phosphodiesterase Type 4 Variant 4. *Cancer Research* **66**, 5624-5632 (2006).
- 36 Onishchenko, N., Karpova, N., Sabri, F., Castrén, E. & Ceccatelli, S. Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. *Journal of Neurochemistry* **106**, 1378-1387 (2008).
- 37 Kaati, G., Bygren, L. O. & Edvinsson, S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur J Hum Genet* **10**, 682-688 (2002).

- 38 Torrens, C., Poston, L. & Hanson, M. A. Transmission of raised blood pressure and endothelial dysfunction to the F2 generation induced by maternal protein restriction in the F0, in the absence of dietary challenge in the F1 generation. *British Journal of Nutrition* **100**, 760-766 (2008).
- 39 Burdge, G. C., Slater-Jefferies, J., Torrens, C., Phillips, E. S., Hanson, M. A., & Lillycrop, K. A. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *British Journal of Nutrition* **97**, 435-439 (2007).
- 40 Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, M. & Skinner, M. K. Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. *Science* **308**, 1466-1469 (2005).
- 41 Tomat, A. L., Inserra, F., Veiras, L., Vallone, M. C., Balaszczuk, A. M., Costa, M. A., & Arranz, C. Moderate zinc restriction during fetal and postnatal growth of rats: effects on adult arterial blood pressure and kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R543-549 (2008).
- 42 Halas, E. S., Hunt, C. D. & Eberhardt, M. J. Learning and memory disabilities in young adult rats from mildly zinc deficient dams. *Physiology & Behavior* **37**, 451-458 (1986).
- 43 Halas, E. S., Eberhardt, M. J., Diers, M. A. & Sandstead, H. H. Learning and memory impairment in adult rats due to severe zinc deficiency during lactation. *Physiology & Behavior* **30**, 371-381 (1983).
- 44 Beach, R. S., Gershwin, M. E. & Hurley, L. S. Gestational zinc deprivation in mice: persistence of immunodeficiency for three generations. *Science* **218**, 469-471 (1982).
- 45 Vruwink, K. G., Hurley, L. S., Gershwin, M. E. & Keen, C. L. Gestational zinc deficiency amplifies the regulation of metallothionein induction in adult mice. *Proc Soc Exp Biol Med* **188**, 30-34 (1988).
- 46 Bannister, A. J. & Kouzarides, T. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**, 641-643 (1996).
- 47 Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H. & Nakatani, Y. The Transcriptional Coactivators p300 and CBP Are Histone Acetyltransferases. *Cell* **87**, 953-959 (1996).
- 48 Yang, X.-J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J.-i., Howard, B. H. & Nakatani, Y. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**, 319-324 (1996).
- 49 Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. & Li, E. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* **99**, 247-257 (1999).

- 50 Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* **16**, 6-21 (2002).
- 51 Margoshes, M. & Vallee, B. L. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society* **79**, 4813-4814 (1957).
- 52 Blindauer, C. A. & Leszczyszyn, O. I. Metallothioneins: unparalleled diversity in structures and functions for metal ion homeostasis and more. *Natural Product Reports* **27**, 720-741 (2010).
- 53 Huang, I. Y. & Yoshida, A. Mouse liver metallothioneins. Complete amino acid sequence of metallothionein-I. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 8217-8221 (1977).
- 54 Kägi, J. H. R. & Vallee, B. L. Metallothionein: a Cadmium- and Zinc-containing Protein from Equine Renal Cortex. *Journal of Biological Chemistry* **235**, 3460-3465 (1960).
- 55 Kägi, J. H. R., Vallee, B. L. & With the technical assistance of Janet, M. C. Metallothionein: a Cadmium and Zinc-containing Protein from Equine Renal Cortex. *Journal of Biological Chemistry* **236**, 2435-2442 (1961).
- 56 Liu, J., Liu, Y., Michalska, A. E., Choo, K. H. & Klaassen, C. D. Metallothionein plays less of a protective role in cadmium-metallothionein-induced nephrotoxicity than in cadmium chloride-induced hepatotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **276**, 1216-1223 (1996).
- 57 Liu, J., Liu, Y., Habeebu, S. S. & Klaassen, C. D. Susceptibility of MT-Null Mice to Chronic CdCl₂-Induced Nephrotoxicity Indicates That Renal Injury Is Not Mediated by the CdMT Complex. *Toxicological Sciences* **46**, 197-203 (1998).
- 58 Habeebu, S. S., Liu, J., Liu, Y. & Klaassen, C. D. Metallothionein-Null Mice Are More Sensitive than Wild-Type Mice to Liver Injury Induced by Repeated Exposure to Cadmium. *Toxicological Sciences* **55**, 223-232 (2000).
- 59 Yoshida, M., Satoh, M., Shimada, A., Yasutake, A., Sumi, Y., & Tohyama, C. Pulmonary toxicity caused by acute exposure to mercury vapor is enhanced in metallothionein-null mice. *Life Sciences* **64**, 1861-1867 (1999).
- 60 Yoshida, M., Watanabe, C., Satoh, M., Yasutake, A., Sawada, M., Ohtsuka, Y., Akama, Y., & Tohyama, C. Susceptibility of Metallothionein-Null Mice to the Behavioral Alterations Caused by Exposure to Mercury Vapor at Human-Relevant Concentration. *Toxicological Sciences* **80**, 69-73 (2004).
- 61 Tohyama, C. Satoh, M., Kodama, N., Nishimura, H., Choo, A., Michalska, A., Kanayama, Y., & Naganuma, A. Reduced retention of cadmium in the liver of metallothionein-null mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **1**, 213-216 (1996).

- 62 Liu, J., Liu, Y., Michalska, A. E., Choo, K. H. A. & Klaassen, C. D. Distribution and Retention of Cadmium in Metallothionein I and II Null Mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **136**, 260-268, doi:DOI: 10.1006/taap.1996.0033 (1996).
- 63 Maret, W. & Vallee, B. L. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3478-3482 (1998).
- 64 Jiang, L.-J., Maret, W. & Vallee, B. L. The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3483-3488 (1998).
- 65 Jacob, C., Maret, W. & Vallee, B. L. Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3489-3494 (1998).
- 66 Lazo, J. S., Kondo, Y., Dellapiazza, D., Michalska, A. E., Choo, K. H., & Pitt, B. R. Enhanced Sensitivity to Oxidative Stress in Cultured Embryonic Cells from Transgenic Mice Deficient in Metallothionein I and II Genes. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 5506-5510 (1995).
- 67 Zheng, H., Liu, J., Liu, Y. & Klaassen, C. D. Hepatocytes from metallothionein-I and II knock-out mice are sensitive to cadmium- and tert-butylhydroperoxide-induced cytotoxicity. *Toxicology Letters* **87**, 139-145 (1996).
- 68 Sato, M., Apostolova, M. D., Hamaya, M., Yamaki, J., Choo, K. H. A., Michalska, A. E., Kodama, N., & Tohyama, C. Susceptibility of metallothionein-null mice to paraquat. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **1**, 221-225 (1996).
- 69 Studer, R., Vogt, C. P., Cavigelli, M., Hunziker, P. E. & Kagi, J. H. Metallothionein accretion in human hepatic cells is linked to cellular proliferation. *Biochem J* **328** (Pt 1), 63-67 (1997).
- 70 Zhang, B., Satoh, M., Nishimura, N., Suzuki, J. S., Sone, H., Aoki, Y., & Tohyama, C. Metallothionein Deficiency Promotes Mouse Skin Carcinogenesis Induced by 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene. *Cancer Research* **58**, 4044-4046 (1998).
- 71 Suzuki, J. S., Nishimura, N., Zhang, B., Nakatsuru, Y., Kobayashi, S., Satoh, M., & Tohyama, C. Metallothionein deficiency enhances skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in metallothionein-null mice. *Carcinogenesis* **24**, 1123-1132 (2003).
- 72 Kondo, Y., Himeno, S., Endo, W., Mita, M., Suzuki, Y., Nemoto, K., Akimoto, M., Lazo, J. S., & Imura, N. Metallothionein modulates the carcinogenicity of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in mice. *Carcinogenesis* **20**, 1625-1628 (1999).

- 73 Sato, M., Kawakami, T., Kondoh, M., Takiguchi, M., Kadota, Y., Himeno, S., & Suzuki, S. Development of high-fat-diet-induced obesity in female metallothionein-null mice. *FASEB J.* **24**, 2375-2384 (2010).
- 74 Stillman, M. J. Metallothioneins. *Coordination Chemistry Reviews* **144**, 461-511 (1995).
- 75 Hager, L. J. & Palmiter, R. D. Transcriptional regulation of mouse liver metallothionein-I gene by glucocorticoids. *Nature* **291**, 340-342 (1981).
- 76 Karin, M., Andersen, R. D., Slater, E., Smith, K. & Herschman, H. R. Metallothionein mRNA induction in HeLa cells in response to zinc or dexamethasone is a primary induction response. *Nature* **286**, 295-297 (1980).
- 77 Schroeder, J. J. & Cousins, R. J. Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 3137-3141 (1990).
- 78 De, S. K., McMaster, M. T. & Andrews, G. K. Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 15267-15274 (1990).
- 79 Satomi, O., Daisuke, K., Kyong-Son, M., Kahori, O.-I. & Keichi, T. Induced synthesis of metallothionein by ascorbic acid in mouse liver. *Toxicology* **43**, 251-259 (1987).
- 80 Garrett, S. H., Xiaoyan, X., Apizono, K. & Brady, F. O. Phorbol ester induction of rat hepatic metallothionein in vivo and in vitro. *International Journal of Biochemistry* **24**, 1669-1676 (1992).
- 81 Lee, D. K., Carrasco, J., Hidalgo, J. & Andrews, G. K. Identification of a signal transducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression. *Biochem. J.* **337**, 59-65 (1999).
- 82 Kotsonis, F. N. & Klaassen, C. D. Increase in hepatic metallothionein in rats treated with alkylating agents. *Toxicology and Applied Pharmacology* **51**, 19-27 (1979).
- 83 Masao, S., Atsushi, O., Koichiro, T., Hiroshi, M. & Yasushi, N. Metallothionein-I accumulation in the rat lung following a single paraquat administration. *Toxicology Letters* **45**, 41-47 (1989).
- 84 Ghoshal, K., Wang, Y., Sheridan, J. F. & Jacob, S. T. Metallothionein Induction in Response to Restraint Stress. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 27904-27910 (1998).
- 85 Fornace, A. J., Jr, Schalch, H. & Alamo, I., Jr. Coordinate induction of

- metallothioneins I and II in rodent cells by UV irradiation. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4716-4720 (1988).
- 86 Solis, W. A., Childs, N. L., Weedon, M. N., He, L., Nebert, D. W., & Dalton, T. P. Retrovirally Expressed Metal Response Element-Binding Transcription Factor-1 Normalizes Metallothionein-1 Gene Expression and Protects Cells against Zinc, but Not Cadmium, Toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* **178**, 93-101 (2002).
- 87 Ohtsuji, M., Katsuoka, F., Kobayashi, A., Aburatani, H., Hayes, J. D., & Yamamoto, M. Nrf1 and Nrf2 Play Distinct Roles in Activation of Antioxidant Response Element-dependent Genes. *J. Biol. Chem.* **283**, 33554-33562 (2008).
- 88 Collingwood, T., Urnov, F. & Wolffe, A. Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol* **23**, 255-275 (1999).
- 89 Haq, F., Mahoney, M. & Koropatnick, J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **533**, 211-226 (2003).
- 90 Radtke, F., Heuchel, R., Georgiev, O., Hergersberg, M., Gariglio, M., Dembic, Z., & Schaffner, W. Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *EMBO J* **12**, 1355-1362 (1993).
- 91 Li, Y., Kimura, T., Huyck, R. W., Laity, J. H. & Andrews, G. K. Zinc-Induced Formation of a Coactivator Complex Containing the Zinc-Sensing Transcription Factor MTF-1, p300/CBP, and Sp1. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4275-4284 (2008).
- 92 Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., & Aguet, M., Schaffner W. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *Embo J* **13**, 2870-2875 (1994).
- 93 Koizumi, S., Yamada, H., Suzuki, K. & Otsuka, F. Zinc-specific activation of a HeLa cell nuclear protein which interacts with a metal responsive element of the human metallothionein-IIA gene. *European Journal of Biochemistry* **210**, 555-560 (1992).
- 94 Bittel, D., Dalton, T., Samson, S. L. A., Gedamu, L. & Andrews, G. K. The DNA Binding Activity of Metal Response Element-binding Transcription Factor-1 Is Activated in Vivo and in Vitro by Zinc, but Not by Other Transition Metals. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 7127-7133 (1998).
- 95 Koizumi, S., Suzuki, K., Ogra, Y., Yamada, H. & Otsuka, F. Transcriptional activity and regulatory protein binding of metal-responsive elements of the human metallothionein-IIA gene. *European Journal of Biochemistry* **259**, 635-642 (1999).
- 96 Palmiter, R. D. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America* **91**, 1219-1223 (1994).
- 97 He, X. & Ma, Q. Induction of Metallothionein I by Arsenic via Metal-activated Transcription Factor 1: Critical role of C-terminal cysteine residues in arsenic sensing. *J. Biol. Chem.* **284**, 12609-12621 (2009).
- 98 Shiizaki, K., Ohsako, S., Koyama, T., Nagata, R., Yonemoto, J., & Tohyama, C. Lack of CYP1A1 expression is involved in unresponsiveness of the human hepatoma cell line SK-HEP-1 to dioxin. *Toxicology Letters* **160**, 22-33 (2005).
- 99 Susan, J. C., Harrison, J., Paul, C. L. & Frommer, M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucl. Acids Res.* **22**, 2990-2997 (1994).
- 100 Wells, J., Graveel, C. R., Bartley, S. M., Madore, S. J. & Farnham, P. J. The identification of E2F1-specific target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 3890-3895 (2002).
- 101 Lee, T. I., Johnstone, S. E. & Young, R. A. Chromatin immunoprecipitation and microarray-based analysis of protein location. *Nat. Protocols* **1**, 729-748 (2006).
- 102 Olin, K. L., Shigenaga, M. K., Ames, B. N., Golub, M. S., Gershwin, M. E., Hendrickx, A. G., & Keen, C. L. Maternal dietary zinc influences DNA strand break and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in infant rhesus monkey liver. *Proc Soc Exp Biol Med* **203**, 461-466 (1993).
- 103 Park, J. H., Stoffers, D. A., Nicholls, R. D. & Simmons, R. A. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *The Journal of Clinical Investigation* **118**, 2316-2324 (2008).
- 104 Simmons, R. A., Templeton, L. J. & Gertz, S. J. Intrauterine Growth Retardation Leads to the Development of Type 2 Diabetes in the Rat. *Diabetes* **50**, 2279-2286 (2001).
- 105 Andrews, G. K. & Geiser, J. Expression of the Mouse Metallothionein-I and -II Genes Provides a Reproductive Advantage during Maternal Dietary Zinc Deficiency. *J. Nutr.* **129**, 1643-1648 (1999).
- 106 Dalton, T., Fu, K., Palmiter, R. D. & Andrews, G. K. Transgenic Mice That Overexpress Metallothionein-I Resist Dietary Zinc Deficiency. *J. Nutr.* **126**, 825-833 (1996).
- 107 Kelly, E. J., Quaife, C. J., Froelick, G. J. & Palmiter, R. D. Metallothionein I and II Protect against Zinc Deficiency and Zinc Toxicity in Mice. *J. Nutr.* **126**, 1782-1790 (1996).
- 108 Wells, J. C. K. The Thrifty Phenotype Hypothesis: Thrifty Offspring or Thrifty Mother? *Journal of Theoretical Biology* **221**, 143-161 (2003).
- 109 Ma, Q., Renzelli, A. J., Baldwin, K. T. & Antonini, J. M. Superinduction of CYP1A1

- gene expression. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 12676-12683 (2000).
- 110 Yongyi, B., Gary, X. L., Lyndell, M. & Qiang, M. Superinduction of metallothionein I by inhibition of protein synthesis: Role of a labile repressor in MTF-1 mediated gene transcription. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **20**, 57-68 (2006).
- 111 Ma, Q. Induction and superinduction of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible poly(ADP-ribose) polymerase: Role of the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator transcription activation domains and a labile transcription repressor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **404**, 309-316 (2002).
- 112 Andrews, G. K., Gallant, K. R. & Cherian, M. G. Regulation of the ontogeny of rat liver metallothionein mRNA by zinc. *European Journal of Biochemistry* **166**, 527-531 (1987).
- 113 Issa, J. P., Ottaviano, Y. L., Celano, P., Hamilton, S. R., Davidson, N. E., & Baylin, S. B. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* **7**, 536-540 (1994).
- 114 Maekita, T., Nakazawa, K., Mihara, M., Nakajima, T., Yanaoka, K., Iguchi, M., Arii, K., Kaneda, A., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., Tamura, G., Saito, D., Sugimura, T., Ichinose, M., & Ushijima, T. High Levels of Aberrant DNA Methylation in Helicobacter pylori-Infected Gastric Mucosae and its Possible Association with Gastric Cancer Risk. *Clinical Cancer Research* **12**, 989-995 (2006).
- 115 Nakajima, T., Maekita, T., Oda, I., Gotoda, T., Yamamoto, S., Umemura, S., Ichinose, M., Sugimura, T., Ushijima, T., & Saito, D. Higher Methylation Levels in Gastric Mucosae Significantly Correlate with Higher Risk of Gastric Cancers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **15**, 2317-2321 (2006).
- 116 Glória, L., Cravo, M., Pinto, A., de Sousa, L. S., Chaves, P., Leitão, C. N., Quina, M., Mira, F. C., & Soares, J. DNA hypomethylation and proliferative activity are increased in the rectal mucosa of patients with long-standing ulcerative colitis. *Cancer* **78**, 2300-2306 (1996).
- 117 Yoshida, T., Yamashita, S., Takamura-Enya, T., Niwa, T., Ando, T., Enomoto, S., Maekita, T., Nakazawa, K., Tatematsu, M., Ichinose, M., & Ushijima, T. Alu and Sata hypomethylation in Helicobacter pylori-infected gastric mucosae. *International Journal of Cancer* in press (2010).
- 118 Fujiki, K., Kano, F., Shiota, K. & Murata, M. Expression of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes. *BMC Biology* **7**, 38 (2009).
- 119 Anier, K., Malinovskaja, K., Aonurm-Helm, A., Zharkovsky, A. & Kalda, A. DNA

- Methylation Regulates Cocaine-Induced Behavioral Sensitization in Mice. *Neuropsychopharmacology* **35**, 2450-2461 (2010).
- 120 Prohaska, J. R., Luecke, R. W. & Jasinski, R. Effect of Zinc Deficiency from Day 18 of Gestation and/or during Lactation on the Development of Some Rat Brain Enzymes. *J. Nutr.* **104**, 1525-1531 (1974).
- 121 Miller, S. I., Del Villano, B. C., Flynn, A. & Krumhansl, M. Interaction of alcohol and zinc in fetal dysmorphogenesis. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **18**, 311-315 (1983).
- 122 Cox, D. H., Chu, R. C. & Schlicker, S. A. Zinc Deficiency in the Maternal Rat during Gestation, and Zinc, Iron, Copper, and Calcium Content and Enzyme Activity in Maternal and Fetal Tissues. *J. Nutr.* **98**, 449-458 (1969).